

03062⁵₂₉

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

"NEUROTOXICIDAD DEL IÓN 1-METIL-4-FENILPIRIDINIO SOBRE LAS NEURONAS
GABAÉRGICAS DE LA SUSTANCIA NIGRA"

TRABAJO DE TESIS QUE PRESENTA

DIANA JASSO LOPEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN

INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

(ÁREA NEUROCIENCIAS)

MEXICO, D. F., 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
I - RESUMEN	2
II - INTRODUCCION	5
A) Sistema de ganglios basales	5
B) Sustancia nigra	8
1.- Neurotransmisores en la sustancia nigra: GABA y Dopamina	8
1a.- GABA	9
1b.- Dopamina	11
2.- Vías aferentes a la Sustancia nigra ...	12
3.- Vías eferentes de la Sustancia nigra ...	13
C) Enfermedad de Parkinson	18
1.- Sintomatología de la enfermedad de Parkinson	19
2.- Núcleos cerebrales que se alteran en la enfermedad de Parkinson	24
D) MPTP como modelo de la enfermedad de Parkinson	31
1.- Estudios en primates	33
2.- Estudios en roedores	37
E) Mecanismo de acción del MPTP	41
F) Neurotoxicidad selectiva del MPTP	46
III - OBJETIVOS	48
IV - MATERIAL Y METODOS	50
V - RESULTADOS	58
A) Alteraciones ^{en la conducta motora} conductuales inducidas por la administración intranigral de MPP+	58

B) Modificación por nomifensina de las alteraciones conductuales inducidas por la administración de MPP+ intranigral59
C) Alteraciones histológicas producidas por la administración intranigral de MPP+ en la sustancia nigra de la rata61
D) Actividad enzimática de la GAD de la sustancia nigra después de la administración de MPP+ intranigral64
E) Cuantificación de los niveles de aminoácidos 24 horas después de la administración intranigral de MPP+67
F) Cuantificación de los niveles de dopamina estriatal en ratas que se les administró MPP+ intranigral67
G) Alteraciones de la actividad enzimática de la GAD por el MPP+ <i>in vitro</i>70
H) Efecto <i>in vitro</i> del MPP+ sobre la cinética enzimática de la GAD73
I) Efecto <i>in vitro</i> del MPP+ sobre la actividad enzimática de la CAT76
J) Efecto <i>in vitro</i> del MPP+ sobre la actividad enzimática de la LDH76
VI - DISCUSION79
A) Alteraciones conductuales inducidas por la administración intranigral de MPP+79
B) Neurotoxicidad del MPP+ sobre las neuronas GABAérgicas83
C) Inhibición de la actividad de la GAD agregando el MPP+ <i>in vitro</i>86
VII - REFERENCIAS89

ORGANIZACION DE LA TESIS

Primeramente, la tesis contiene una introducción en donde se abordan las principales características de la sustancia nigra (SN) y sus conexiones con otros núcleos; después se presentan aspectos generales de la enfermedad de Parkinson y se abordan algunas características de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) como modelo experimental de este padecimiento, se resalta su mecanismo de acción y diversas evidencias que permiten pensar que es una droga inespecífica que no solo afecta neuronas dopaminérgicas. Con estos antecedentes, en la sección concerniente a los objetivos se plantea el problema de estudio y después se describen los resultados obtenidos. Por último, se discuten los datos experimentales obtenidos y se hace un análisis de ellos relacionándolos con la literatura existente sobre este tema.

I - RESUMEN

Los mecanismos por los que se producen los desórdenes neurológicos relacionados con el movimiento no son muy claros. En el caso de la enfermedad de Parkinson, se tienen evidencias de que la dopamina que se encuentra en la vía nigroestriatal está involucrada de manera importante. Sin embargo, existen algunas evidencias de que otros neurotransmisores como la acetilcolina y el ácido γ -aminobutírico (GABA) también se alteran de manera importante en estados más avanzados del Parkinsonismo.

El descubrimiento de que la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) produce en humanos un síndrome parkinsoniano permitió desarrollar modelos animales que reflejan de una manera más clara las características de esta enfermedad, y como resultado de ello se ha obtenido mayor información acerca de los posibles mecanismos responsables de su generación. Gracias al conocimiento del metabolismo del MPTP y de su forma de acción, se ha sugerido que podría existir alguna sustancia endógena o ambiental, que por su parecido estructural provoque dicha enfermedad.

Por otra parte, la manera como se alteran los sistemas de neurotransmisión dentro de los ganglios basales para que se produzcan desórdenes del movimiento ha sido materia de investigación constante. Se sabe que los sistemas GABAérgicos, nigrotalámico y estriatopalidal, están involucrados importantemente

en la expresión de las señales de salida de este sistema (ganglios basales), por lo que alteraciones en su funcionamiento resultan en fallas del movimiento. A este respecto, la relación que tiene el MPTP con los sistemas GABAérgicos de los ganglios basales no ha sido muy estudiada.

Con estos antecedentes el presente trabajo se enfocó a elaborar un modelo de neurotoxicidad inducido por la inyección del metabolito del MPTP, el ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) en la sustancia nigra reticulada (SNr) de la rata, y se evaluaron las alteraciones conductuales y neuroquímicas resultantes de esta administración. Los resultados muestran un daño muy pronunciado de las neuronas GABAérgicas de la SNr, lo que nos hace concluir que la especificidad del MPTP para las neuronas dopaminérgicas no es absoluta. Paralelamente a esta alteración de las neuronas GABAérgicas de la SNr también se observó una conducta de giro contralateral después de la administración del MPP+ intranigral. Por otra parte, se realizó un estudio *in vitro* en el que se valoró la interacción del MPP+ con la glutamato descarboxilasa (GAD), enzima limitante de la síntesis de GABA, y se encontró que el MPP+ inhibe de manera no competitiva su actividad, mientras que no afectó la actividad de otras enzimas como la colín-acetiltransferasa (CAT) y la deshidrogenasa láctica (LDH).

Con los resultados obtenidos, el presente trabajo aporta la posibilidad de un mecanismo adicional por el que el MPTP puede estar ejerciendo sus efectos neurotóxicos.

Abreviaturas utilizadas

ACh	-	Acetilcolina
AHV	-	Acido homovanílico
AVT	-	Area ventral tegmental
CAT	-	Colin-acetil-transferasa
COMT	-	Catecol-O-metiltransferasa
DA	-	Dopamina
DOPAC	-	Acido 3,4-dihidroxifenilacético
D1	-	Receptores dopaminérgicos tipo 1
D2	-	Receptores dopaminérgicos tipo 2
GABA	-	Acido γ -aminobutírico
GAD	-	Glutamato descarboxilasa
GP	-	Globo pálido
HPLC	-	Cromatografía líquida de alta presión
LDH	-	Deshidrogenasa láctica
L-Dopa	-	L-Dihidroxifenilalanina
MAO	-	Monoaminooxidasa
MPDP+	-	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina
MPP+	-	ión 1-metil-4-fenilpiridinio
MPTP	-	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	-	Noradrenalina
NMDA	-	N-Metil-D-Aspartato
PLP	-	Fosfato de piridoxal
RPM	-	Revoluciones por minuto
5-HIAA	-	Acido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	-	Serotonina
SN	-	Sustancia nigra
SNC	-	Sustancia nigra compacta
SNL	-	Sustancia nigra <i>pars lateralis</i>
SNr	-	Sustancia nigra reticulada
TH	-	Tirosina hidroxilasa

II - INTRODUCCION

A) Sistema de ganglios basales

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales interconectados entre sí, que se encuentran en el telencéfalo, diencéfalo y cerebro medio e incluyen estructuras como el estriado, el tálamo, la sustancia nigra, el globo pálido y el núcleo subtalámico (Fig. 1) (Nauta y Domesick, 1984). Los ganglios basales reciben señales de gran parte de la corteza, distribuyen esta información entre sus diferentes núcleos y después de procesarla es enviada a regiones particulares de los lóbulos frontales y del tallo cerebral (Graybiel, 1990). Además, se sabe que existen gran cantidad de circuitos internucleares en los ganglios basales y sus estructuras relacionadas, con circuitos adicionales de control dentro de cada núcleo (Kitai, 1981).

El conocimiento que se ha obtenido acerca de la función de los ganglios basales ha sido influenciado fuertemente por los padecimientos generados como resultado de diversos desórdenes funcionales en sus núcleos. Uno de estos importantes padecimientos es la enfermedad de Parkinson; el hecho de que en este desorden exista una dificultad para iniciar movimientos ha dado lugar a sugerir que los ganglios basales están involucrados en la "ejecución automática de movimientos motores aprendidos". En este contexto, se ha considerado a los ganglios basales como una entidad

encargada de la secuencia de programas motores (Albin et al., 1989).

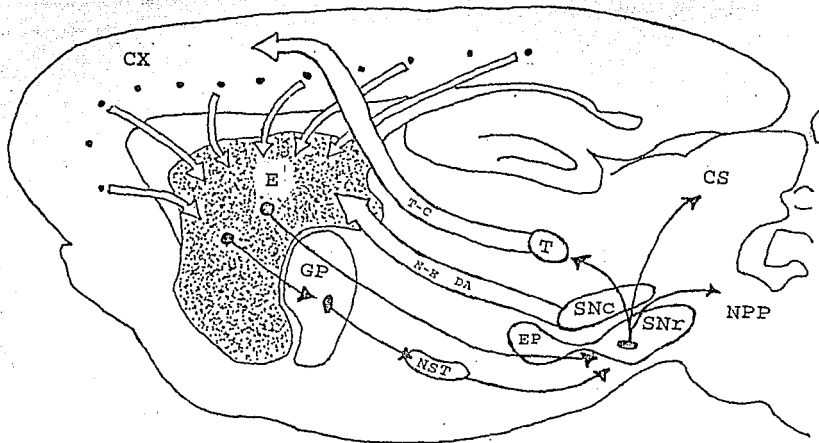


Figura 1. Representación esquemática de las conexiones principales de los ganglios basales. Globo pálido (GP), núcleo entopeduncular (EP), sustancia nigra reticulada (SNr), sustancia nigra compacta (SNC), núcleo pedunculo pontino (NPP), Dopamina (DA), tálamo (T), colículo superior (CS), corteza (Cx), vía talámocortical (T-C), vía nigroestriatal (N-E) (Modificado de Gerfen, 1992).

Dentro de los ganglios basales el estriado es la vía de entrada más importante de información, ya que recibe aferencias de la mayor parte de la corteza cerebral (Fig. 1). El estriado, en la mayoría de los mamíferos, está formado por el núcleo caudado y el putamen que, en primates, se encuentran divididos por fibras de la cápsula interna. La compartimentalización neuroquímica del estriado

refleja la existencia de unidades de procesamiento local distribuidas a través de este núcleo, que producen un patrón particular de interacción de los suministros corticales con los sistemas de salida del estriado (Gerfen, 1987a).

El estriado contiene diversas subpoblaciones de neuronas que están organizadas en compartimentos funcionales llamados de "parche" o "estriosomas" y de "matriz". La matriz contiene principalmente neuronas colinérgicas y los parches presentan neuronas encefalinérgicas, peptidérgicas y somatostatinérgicas (Graybiel, 1990). Una de las principales fuentes de información a estas estructuras son las neuronas de las diferentes capas de la corteza cerebral que envían aferencias al estriado y se distribuyen diferencialmente en los parches y la matriz (Gerfen, 1989). Siguiendo este mismo patrón diferencial, los suministros dopaminérgicos del área ventral tegmental (AVT) (A10) y del área reticulobulbar (A8) se distribuyen en la matriz estriatal y los suministros dopaminérgicos de la sustancia nigra se distribuyen tanto en los parches como en la matriz estriatal (Gerfen, 1987b).

Por otra parte, los principales núcleos eferentes de los ganglios basales en primates son el globo pálido medial (núcleo entopeduncular en otras especies) y la SNr, los cuales inhiben tónicamente a los núcleos talámicos ventrales y al colículo superior (Albin et al., 1989; Gerfen, 1992). El tálamo es el sitio principal de convergencia de los ganglios basales y, junto con el cerebelo, envía sus eferencias a la corteza motora (Kitai, 1981).

B) Sustancia nigra

La sustancia nigra se localiza en el tegmento ventral del cerebro medio (Fig. 1) y se divide en sustancia nigra compacta (SNc), sustancia nigra reticulada (SNr) y sustancia nigra *pars lateralis* (SNl) (Fallon y Loughlin, 1985).

La SNc contiene una acumulación densa de neuronas dopaminérgicas que extienden sus dendritas caudoventralmente en la SNr. Además, la colecistoquinina coexiste con la dopamina de algunas neuronas situadas medialmente en la SNc (Bolam et al., 1991). Esta región también contiene neuronas colinérgicas y altas concentraciones de dinorfina (Vincent et al., 1982).

La SNr contiene principalmente neuronas GABAérgicas, y en menor proporción, neuronas encefalinérgicas y terminales sinápticas con sustancia P (Graybiel, 1984; Gerfen et al., 1987a).

1.- Neurotransmisores en la sustancia nigra: GABA y Dopamina

El GABA y la Dopamina (DA) son dos neurotransmisores importantes dentro de la SN para la expresión de conductas motoras, lo que se desprende del hecho de que las alteraciones en la transmisión sináptica mediada por estos neurotransmisores producen cambios motores muy notables.

1a.- GABA. En relación al GABA, se sabe que en el cerebro de mamíferos adultos se sintetiza principalmente a partir del ácido glutámico y que esta síntesis se produce en una sola reacción enzimática, catalizada por la glutamato descarboxilasa (GAD) que es una enzima que utiliza fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor. Se ha demostrado que existen dos formas de GAD que difieren en secuencia de aminoácidos, peso molecular, localización subcelular, interacción con el PLP, y expresión en diferentes regiones del cerebro y en diferentes etapas del desarrollo (Martin y Rimvall, 1993).

La primera forma de la GAD está compuesta de 585 aminoácidos, tiene un peso molecular aparente de 65,400 y se denomina GAD₆₅. Esta enzima se localiza principalmente en las terminales nerviosas y se encuentra soluble en el citoplasma. La GAD₆₅ constituye aproximadamente el 50% de la cantidad total de GAD que se encuentra en el cerebro y parece estar principalmente como apoenzima, ya que no presenta al cofactor (PLP) unido.

La segunda forma de GAD está compuesta de 593 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de 66,600 por lo que se denomina GAD₆₇, se encuentra saturada casi completamente con PLP, se asocia fácilmente a la membrana y se distribuye a través de toda la neurona (Tapia, 1983; Kaufman et al., 1991b; Erlander et al., 1991).

El GABA produce su efecto inhibitorio a través de la interacción con dos tipos de receptores: el tipo A y el tipo B.

Receptor tipo A: El receptor GABA_A tiene un canal de Cl⁻ y un

sitio de unión a benzodiazepinas. La activación de este receptor da lugar a un movimiento de iones de Cl^- , lo que origina que se hiperpolarice la membrana, de tal modo que durante la activación de los receptores excitadores no se alcanza el umbral de disparo, produciendo su efecto inhibitorio. Los receptores GABA_A están compuestos de varias subunidades que se denominan α , β , τ y δ , las cuáles se asocian de maneras distintas en varias regiones del cerebro, dando lugar a la existencia de varios subtipos de receptores GABA_A (Wisden y Seeburg, 1992).

Receptor tipo B: A diferencia del otro tipo, el receptor GABA_B se acopla a canales de Ca^{2+} y K^+ por medio de proteínas Gs inhibitorias. Se cree que existen dos posibles mecanismos por los que los receptores GABA_B regulan los canales de Ca^{2+} ; el primer mecanismo sería un acoplamiento directo de los receptores a los canales de Ca^{2+} dentro de la membrana a través de una proteína G, y el segundo mecanismo involucraría la activación de la fosfolipasa A_2 dando lugar a la producción de ácido araquidónico, que estimularía a la proteína cinasa C. Por otro lado, la relación de los receptores GABA_B con los canales de K^+ se ha visto principalmente en células piramidales de hipocampo, y para que se activen dichos canales se requiere la participación de una proteína G excitadora, dando como resultado una corriente saliente de K^+ que es inhibitoria (Borman, 1988). Los receptores GABA_B participan de manera importante en la modulación de la liberación de otros neurotransmisores.

1b.- Dopamina. La DA, que es el otro neurotransmisor importante dentro de la SN, se sintetiza a partir de la tirosina, siendo la tirosina hidroxilasa (TH) la enzima limitante de su síntesis. Esta enzima se encuentra en forma soluble en el interior de la neurona.

Se conoce que existen principalmente dos tipos de receptores dopaminérgicos para que la DA lleve a cabo su efecto, y que se han denominado receptores tipo D1 y receptores tipo D2 (Andersen et al., 1990).

Receptor D1: Se asocian con la activación de la adenilato ciclasa y se encuentran acoplados a proteínas Gs reguladoras.

Receptor D2: Estos receptores inhiben la actividad de la adenilato ciclasa, el recambio de fosfatidil inositol y la movilización de Ca^{2+} interno. Además de que se ha descrito que incrementan la actividad de los canales de K^+ (Sibley et al., 1992).

Clásicamente la DA se ha clasificado como un neurotransmisor inhibidor, sin embargo, ahora se sabe que su efecto final depende del tipo del receptor en el que actúa. De este modo, cuando se da la activación de los receptores D1 se produce un efecto excitador y, de manera opuesta, cuando se activan los receptores D2 el efecto es inhibitorio.

2.- Vías aferentes a la sustancia nigra

Las principales vías neuronales que proyectan hacia la SN son la proyección estriatonigral, la pálido-nigral y la subtálamo-nigral (Fig. 2). A continuación se mencionan algunas características importantes de cada una de ellas.

Proyección estriatonigral: Las fibras que conforman esta vía contienen GABA y sustancia P. Las fibras de la cabeza del caudado proyectan a la parte rostral de la SN, mientras que las fibras del putamen hacen conexión en las porciones caudales; por otra parte, las regiones dorsales del putamen envían sus axones a las partes laterales de la SN y las regiones ventrales hacia las partes mediales. Existen evidencias de una relación topográfica de las neuronas de proyección de los parches y la matriz hacia la SN, de este modo las neuronas de los parches proyectan a la SNC y las neuronas de la matriz proyecta a la SNr (Gerfen, 1984).

Proyección pálido-nigral: Esta vía emerge de neuronas que se encuentran en el globo pálido medial y cuyos axones proyectan principalmente a las neuronas dopaminérgicas de la SNC.

Proyección subtálamo-nigral: Respecto a esta vía neuronal, se sabe que el núcleo subtalámico envía proyecciones glutamatérgicas hacia la SNr (Albin et al., 1989). Esta vía es, en parte, responsable de la actividad tónica de las neuronas GABAérgicas de la SNr (Gerfen,

1992).

Además de las vías mencionadas anteriormente, existen otras vías aferentes a la SN. Así por ejemplo, este núcleo recibe fibras serotoninérgicas que se proyectan desde el núcleo rafé y del núcleo central amigdalóide (Carpenter, 1981). Por otra parte, en la SN existen neuronas catecolaminérgicas que podrían provenir del sistema pontomesencefálico tegmental (Pasik et al., 1991).

3.- Vías eferentes de la sustancia nigra

Las principales vías de emisión de información que surgen de la SN son la nigroestriatal, la nigrotalámica y la nigrocolicular, de las cuáles a continuación se mencionan algunos aspectos relevantes de cada una de ellas.

Proyección nigroestriatal: Esta vía contiene dopamina como neurotransmisor y se subdivide en:

1) Sistema nigroestriatal: Conformada por neuronas de la SNC que proyecta a gran parte del estriado.

2) Sistema mesolímbico: Esta vía neuronal parte de la porción medial de la SNC y neuronas A10 del AVT y proyectan al estriado, núcleo acumbens y tubérculo olfatorio (Nauta et al., 1984).

Las neuronas dopaminérgicas de la SNC rostral y ventral (que tienen sus dendritas en la SNr) proyectan a la matriz dorsolateral

estriatal. Por otra parte, las neuronas dopaminérgicas de la SNr ventrolateral proyectan a los parches localizados en el estriado dorsolateral. Respecto a esto, parece existir un arreglo topográfico de las proyecciones nigroestriatales que proyectan a los parches, ya que las neuronas de la SNC medial proyectan a los parches estriatales mediales y las neuronas de la SNC lateral proyectan a los parches más laterales. Este arreglo es más rígido que el arreglo de las proyecciones hacia la matriz estriatal, ya que en este caso las interconexiones son más difusas. Respecto al otro grupo de neuronas que forman el sistema mesolímbico, las neuronas del AVT envían sus proyecciones principalmente a la matriz estriatal.

Por último, las neuronas en la SNr rostromedial y ventrolateral, envían sus proyecciones a la matriz del estriado. Este grupo de neuronas, a diferencia de las mencionadas anteriormente no son dopaminérgicas sino que podrían ser GABAérgicas (Gerfen et al., 1987b).

Junto con el segmento interno del globo pálido, la SNr provee las eferentes de los ganglios basales a las estructuras extrínsecas a ellos. Estas vías utilizan GABA como neurotransmisor y presumiblemente participan en el control de eventos motores (Reavill et al., 1984).

Proyección nigrotalámica: Esta vía neuronal esta conformada por fibras GABAérgicas que emergen de la SNr y proyectan a diversos núcleos talámicos, tales como el ventromedial, el centromedial, el paracentral, el parafascicular, el mediodorsal y el lateral dorsal.

Actualmente, se sabe que existe una organización topográfica de las neuronas de proyección de la SNr a el tálamo que se refleja de la siguiente manera: La SNr rostrocaudal proyecta principalmente al núcleo talámico ventromedial, la SNr ventral hacia el núcleo mediodorsal, la SNr dorsal a el núcleo central medial y la SNr dorsolateral proyecta al núcleo rostroventral parafascicular (Deniau y Chevalier, 1992).

La proyección estriatonigral GABAérgica hace contacto con las neuronas de la SNr que proyectan al núcleo ventral talámico, las cuáles también son GABAérgicas, por lo que se forma un circuito con dos vías inhibitorias (Deniau y Chevalier, 1985).

Proyección nigrocolicular: Esta vía eferente de la SN se representa en los primates por fibras que emergen de la SNr y que proyectan a las capas intermedias de la parte caudal y lateral del colículo superior. Por otra parte, en la rata, la proyección nigrocolicular arboriza principalmente en las capas intermedias del colículo superior y existe una proyección más pequeña a las capas coliculares profundas que proviene de la SNl (Deniau y Chevalier, 1992). Esta vía nigrocolicular es GABAérgica y a su vez está influenciada por fibras GABAérgicas que provienen del estriado (Chevalier et al., 1985).

Las proyecciones nigrotalámica, colicular y tegmental están organizadas tópicamente, esto es, formando un arreglo muy preciso. Ello se refleja en la existencia de "láminas" en la SNr que contienen neuronas que inervan sitios particulares en el tálamo, el colículo y el tegmento (Deniau y Chevalier, 1992).

Por último, respecto a otras vías eferentes de la SN, se sabe que la SN y principalmente el AVT envían una proyección a la corteza límbica (Nauta y Domesick, 1984). Algunas células de la SNr proyectan a porciones de la formación reticular rostral mesencefálica, el núcleo pedunculopontino y el núcleo ventral peribranquial, y ciertas regiones de la SNr medial proyectan a los núcleos accesorios oculomotores (Carpenter, 1981).

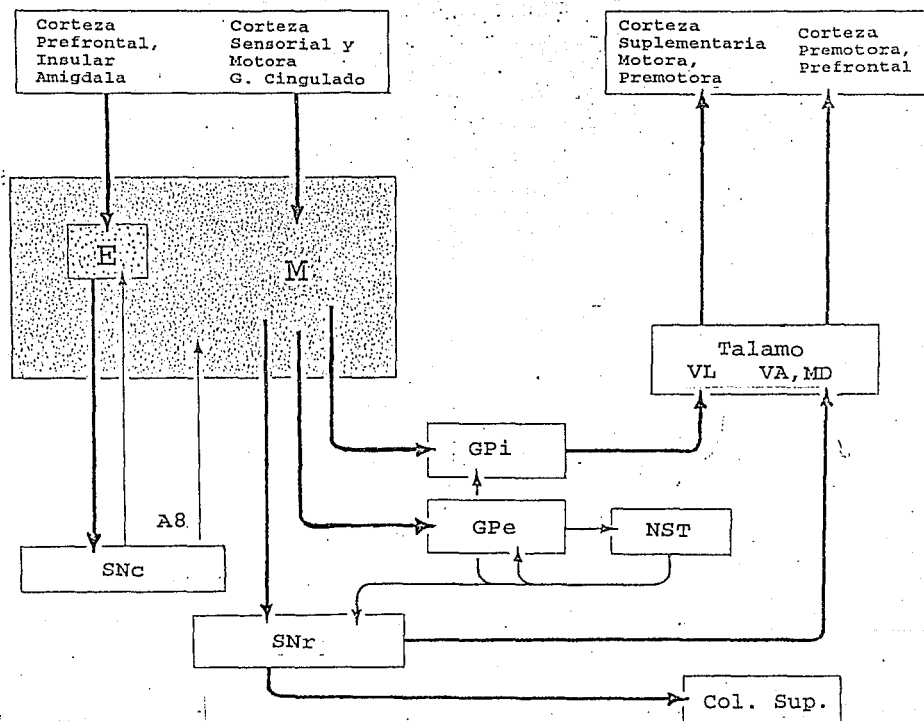


Figura 2. Relaciones de la SN con otros núcleos. Estriosomas (E), matriz (M), globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPi), núcleo mediodorsal talámico (MD), sustancia nigra compacta (SNc), sustancia nigra reticulada (SNr), núcleo subtalámico (NST), núcleo talámico ventral anterior (VA), núcleo talámico ventral lateral (VL) (Modificado de Graybiel, 1990).

C) Enfermedad de Parkinson

Esta enfermedad se describió por primera vez en 1817 cuando James Parkinson publicó su libro "Essay on the Shaking Palsy". En este libro el autor describía las características clínicas de la enfermedad y la denominó "Shaking palsy" o "Paralysis agitans". En esta obra Parkinson realizó una descripción de 6 individuos que presentaban dicho padecimiento, y en la que resalta las siguientes características:

"Locomoción involuntaria temblorosa, con poder muscular perdido aunque estén en reposo o apoyados; con propensión a doblar el tronco hacia adelante, y de pasar de caminar a correr. Los sentimientos y el intelecto no se dañan"

Esta definición la continuó con una sinopsis de la historia natural de la enfermedad. Parkinson creyó que los últimos síntomas de la enfermedad se debían a que el proceso patológico dañaba la porción superior de la médula espinal que involucra la médula oblongata.

Algunas décadas después, Trosseau en 1868 mencionó características clínicas adicionales a la descrita "Paralysis agitans". Así entonces, describió el tipo de rigidez muscular que se observa y el deterioro intelectual al que conlleva dicho padecimiento. Observaciones importantes fueron realizadas también por Charcot quien en 1880 hizo descripciones detalladas sobre el tipo de temblor asociado. Asimismo, La-Salpetriere, en 1885, fue el primero que denominó a la enfermedad como "Maladie de Parkinson".

Una aportación también significativa fue hecha por Gowers en 1893 quien realizó un amplio y completo estudio de la enfermedad examinando 80 casos. En 1895 Brissand sugirió que el daño de la SN podría ser la causa de la bradicinesia y la rigidez del Parkinsonismo, en apoyo a esto en 1963 Hornykiewicz describió que los estriados de pacientes parkinsónicos tenían grandes reducciones de DA (Wooten, 1987). A partir de estas primeras observaciones, el concepto de "Enfermedad de Parkinson" prevalece casi sin cambios hasta nuestros días (Tyler, 1987).

Una observación adicional importante fue realizada en 1912 cuando Friederich Lewy, trabajando con cerebros de pacientes parkinsónicos, reconoció una clase particular de cuerpos de inclusión en células nerviosas del núcleo vago dorsal y núcleo basalis. Algunos años después, Constantin Tretiakoff, en 1919, menciona que los llamados "cuerpos de Lewy" se presentaban como inclusiones hialinas concéntricas en la SN de pacientes Parkinsónicos (Gibb, 1989).

1.- Sintomatología de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson tiene una mayor incidencia entre los 75 y 84 años de edad. La prevalencia es del 0.1% de la población antes de los 60 años y del 1% después de esta edad.

Este padecimiento es un desorden de tipo hipocinético donde las principales características son: acinesia, bradicinesia y

rigidez (Tabla 1). Además, se caracteriza porque se presentan lentitud de movimientos, rigidez, incremento en el tono muscular, paucidad de movimientos espontáneos y temblor (Albin et al., 1989).

TABLA 1. Características motoras del Parkinsonismo

Signos cardinales	Temblor de reposo, Rigidez, Bradicinesia, Acinesia.
Otros signos motores	Hipomimia ("cara de máscara"), hipofonia, disfagia, sialorrea, dificultades respiratorias, pérdida de movimientos asociados, congelamiento, microfagia.
Signos neurooftalmológicos	Sensibilidad visual de contraste dañada, daño visoespacial, decremento en parpadeo.

(Modificado de Jankovic, 1987).

A continuación se hace una breve descripción de los principales síntomas característicos de la enfermedad de Parkinson:

Rigidez: Este síntoma se debe a una hipertonia generalizada que da lugar a inmovilidad. Se da como resultado de un aumento en la reactividad al estiramiento y se presenta como una resistencia uniforme al movimiento. En casos severos se da un imbalance en el tono muscular que trae como consecuencia una postura flexionada (Fig. 3) (De Long et al. 1990).



Figura 3. Postura característica de un enfermo Parkinsónico. La cabeza y el tronco están inclinados hacia adelante, y los brazos se encuentran ligeramente flexionados debido a la rigidez muscular (Modificado de Laurence, 1987).

Bradicinesia: Por este concepto se entiende una lentitud generalizada en los movimientos que puede afectar cualquier parte del cuerpo, cuando se generaliza puede ser más severa en una parte corporal específica (Fahn, 1990).

A diferencia de los individuos normales, en que la amplitud del movimiento se incrementa conforme se incrementa la velocidad del mismo, en los sujetos Parkinsónicos se perturba la relación normal de amplitud-velocidad y los movimientos de amplitud grande se dan a velocidades normalmente bajas, por lo que se producen

movimientos discontinuos con varios movimientos segmentados de pequeña amplitud, que son el resultado de una falla en la iniciación de descargas musculares agonistas adecuadas.

Acinesia: La acinesia involucra múltiples anormalidades del movimiento entre las que se encuentran dificultad para iniciar movimientos, para ejecutar actos motores simultáneos y para ejecutar actos repetidos.

En el Parkinsonismo el tiempo de iniciación de los movimientos tiende a prolongarse y esto se acentúa cuando los movimientos se ejecutan secuencialmente o simultáneamente.

La acinesia se clasifica como una falla de "programación motora" o "planeación motora" (ensamble de programas motores elementales necesarios para movimientos más complejos). Su patofisiología se ha atribuído clásicamente a la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNC, lo que provoca fallas en los mecanismos estriato-palidales. Así mismo, se ha propuesto que este síntoma se debe a un daño del AVT.

En la acinesia, se pierde la capacidad para realizar movimientos rotatorios de las extremidades, además la expresión facial se vuelve rígida y también se pierde el parpadeo. Los Parkinsónicos caminan lentamente y cuando lo hacen tienden a adoptar posturas de "congelamiento", arrastran los pies y tienen los brazos flexionados y el tronco está ligeramente dirigido hacia adelante (Fig. 3). Adicionalmente, los enfermos de Parkinson pueden presentar otros síntomas como son: salivación excesiva, piel

demasiado grasosa debido a una secreción excesiva de sebo y presión sanguínea baja, además de que la voz se reduce de volumen y es común la micrografía (Playfer, 1989).

Temblores: Esta alteración del movimiento se presenta en el 70% de los pacientes enfermos, afecta principalmente a las manos y se acompaña por flexión y extensión de la muñecas. Se presenta principalmente en el reposo pero se puede agravar por disturbios emocionales o cansancio y tiende a desaparecer durante el sueño. Se ha visto que en pacientes jóvenes el temblor es principalmente unilateral, pero conforme el paciente es más viejo tiende a ser bilateral y puede afectar otras partes del cuerpo como la cabeza y el cuello.

Síntomas oculomotores: En relación a esto, los sujetos Parkisónicos tienen dificultad en iniciar los movimientos sacádicos, y cuando los han iniciado, los ejecutan a velocidades menores que los sujetos normales. Se piensa que estas características se deben a una actividad anormal del colículo superior de estos individuos.

Síntomas afectivos: Adicionalmente a las alteraciones físicas, los sujetos enfermos también presentan alteraciones emocionales como depresión. Aproximadamente el 40% de los Parkisónicos sufre de depresión durante el transcurso de la enfermedad, y el 25% presentan depresión antes de que comiencen los síntomas motores

(Mayeux et al., 1981). Puede ser de intensidad moderada a media y ocasionalmente se relaciona con la edad, la duración de la enfermedad, el tratamiento y el sexo (Mayeux, 1987).

Síntomas cognitivos: Otras alteraciones frecuentes que pueden presentar los sujetos Parkinsónicos son deficiencias cognitivas que pueden ir de rasgos mínimos hasta una demencia global. En general los Parkinsónicos presentan demencia degenerativa primaria, bradifrenia (lentitud en el proceso de pensamiento, concentración disminuída e inatención), fallas en funciones de ejecución y desórdenes del lenguaje (Mayeux, 1987). Estos desórdenes son más severos en sujetos que desarrollan la enfermedad en edades más avanzadas (Dubois et al., 1990). El desarrollo tardío de estos síntomas parece deberse a la pérdida de dopamina en el caudado y a la disrupción de circuitos de asociación.

2.- Núcleos cerebrales que se alteran en la Enfermedad de Parkinson

Hoy en día, se sabe que la característica principal de la enfermedad de Parkinson es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN. Esta disminución va del 60% al 90% y se correlaciona con un decremento de DA y AHV en el estriado y AVT, además de que se pierde la actividad de la TH. La pérdida de neuronas en la SN es progresiva y puede ser de hasta un 90% en estados avanzados de la enfermedad; un detalle interesante es que del 1% al 25% de las

neuronas que se preservan en la SNC contienen "cuerpos de Lewy". El daño producido en las neuronas dopaminérgicas de la SNC en la enfermedad de Parkinson se ha correlacionado positivamente con la cantidad de neuromelánina que presentan, lo que se ha hecho evidente porque las neuronas que contienen mayor cantidad de neuromelánina son las más afectadas. Otra alteración cerebral que se ha observado es la aparición de una población especial de neuronas que no se encuentra normalmente; estos grupos celulares contienen neuromelánina pero no muestran inmunorreactividad para la TH (Hirsch et al., 1988), lo que ha hecho pensar que podría tratarse de neuronas dopaminérgicas en proceso de degeneración (Langston, 1988).

Adicionalmente a las alteraciones mencionadas, se ha reportado también que la actividad de la GAD y de la TH disminuye en la SNC, la SNr, el estriado y el AVT. La GAD disminuye alrededor del 80% en la SNC y la SNr (Lloyd et al., 1975) y más del 50% en el estriado (Lloyd y Hornykiewicz, 1973); también hay un ligero decremento de la actividad de la GAD en la corteza y en el globo pálido, así como de la CAT en la SN (Javoy-Agud y Agud; 1980; Javoy-Agud et al. 1981; Lloyd et al., 1975; McGeer et al., 1971). Alteraciones adicionales que se han descrito son la disminución de los niveles de colecistoquinina, encefalinas y sustancia P en la SN (Studler et al., 1982; Llorens-Cortes et al., 1984; Mauborgne et al., 1983), y de las encefalinas y la sustancia P en el putamen y globo pálido (Taquet et al., 1983; Llorens-Cortes et al., 1984).

Sin embargo, a pesar de las alteraciones mencionadas, se

mantienen niveles normales de DA y AHV en la médula espinal lumbar, lo que sugiere que se preserva la proyección dopaminérgica descendente a la médula espinal que provienen del tálamo e hipotálamo caudal.

Asimismo, se han observado lesiones en el *locus coeruleus* y núcleos hipotalámicos relacionados, existe pérdida neuronal y decremento en la concentración de noradrenalina (NA), así como un daño del núcleo del rafé dorsal serotoninérgico, donde la pérdida celular es del 44% (Jellinger, 1990). La degeneración del *locus coeruleus* y del núcleo del rafé dorsal es más severa en pacientes dementes y la reducción de los niveles de serotonina (5-HT) se ha correlacionado con la depresión que se presenta asociada al padecimiento (Mayeux et al., 1987).

También se han hallado alteraciones en el núcleo basalis de Meynert donde puede haber pérdida celular hasta del 80%, y se encuentran "cuerpos de Lewy" en el 90% de los casos (Nakano y Hirano, 1984). A diferencia de algunos datos mostrados anteriormente, en este caso la intensidad del daño no se correlaciona con la edad o la duración de la enfermedad, pero la pérdida celular en este núcleo es mayor en sujetos dementes y se afectan las mismas regiones que se alteran en la enfermedad de Alzheimer (partes intermedia y posterior del núcleo basalis que proyectan a la neocorteza), además de que se observa la misma patología a nivel cortical que se presenta en la enfermedad de Alzheimer (Jellinger, 1990).

Por último, una estructura adicional que se altera en la

enfermedad de Parkinson es el núcleo pedunculopontino, en el que se presenta un decremento de la población neuronal de hasta un 53%.

Cuerpos de Lewy: Ultraestructuralmente los "cuerpos de Lewy" están compuestos de filamentos orientados radialmente y tienen un material denso y amorfo en el centro. Se ha sugerido que la esfingomielina así como varios polipéptidos comunes a los neurofilamentos son componentes del "cuerpo de Lewy".

En la enfermedad de Parkinson los "cuerpos de Lewy" se pueden encontrar en diversas estructuras cerebrales como en la SN, *locus coeruleus*, núcleo *basalis*, tálamo, hipotálamo, núcleo *rafé*, núcleo pedunculopontino, núcleo vago dorsal, columnas interomediales de la médula espinal y ganglios simpáticos. En todas estas estructuras su distribución está ligeramente concentrada en neuronas monoaminérgicas de tamaño medio a grande.

Adicionalmente a los "cuerpos de Lewy", en la enfermedad de Parkinson también se encuentran otras inclusiones neuronales llamadas "cuerpos pálidos granulares". Estos cuerpos no se tiñen con técnicas histológicas convencionales por lo que aparecen como inclusiones no teñidas, ultraestructuralmente están compuestos de un área vacuolada desprovista de mitocondrias y filamentos.

Sin embargo, a pesar de la presencia de estos dos tipos de formaciones (cuerpos de Lewy y cuerpos pálidos granulares), su presencia no se toma como diagnóstico de la enfermedad de Parkinson ya que también se forman en otros desórdenes neurológicos (Gibb,

1989).

La compleja organización anatómica y bioquímica de los ganglios basales y sus múltiples conexiones con otras regiones cerebrales hacen difícil interpretar las anomalías motoras que se producen después de lesiones dentro de los ganglios basales. Por ello, frecuentemente surge la pregunta de si una anomalía motora es una expresión de una disfunción primaria de los ganglios basales o un cambio funcional secundario de áreas influenciadas por los ganglios basales, o si tal vez ambos mecanismos trabajan en paralelo (Benecke, 1989). A pesar de lo anterior, las causas de la enfermedad de Parkinson se han tratado de explicar como una deficiencia de las neuronas de la vía nigroestriatal, que resulta en una serie de cambios complejos en la actividad de las eferentes estriatales, esto es, las proyecciones estriatales al globo pálido medial y SNr son menos activas y la proyección al globo pálido lateral es más activa, todo lo cual daría como resultado una desinhibición de los principales centros aferentes dentro de los ganglios basales y una mayor inhibición de la vía tálamo-cortical (Albin et al., 1989).

El grado de rigidez e hipocinesia en pacientes Parkinsónicos se asocia con las bajas densidades neuronales en las partes laterales de la SN que proyectan principalmente al putamen, y el grado de demencia se asocia con la pérdida celular en el núcleo *basalis* y en la parte medial de la SN que proyectan principalmente al caudado y a áreas límbicas y corticales (Tabla 2) (Rinne et al.,

1989).

TABLA 2. Correlación Clínica-Bioquímica de la enfermedad de Parkinson

Síntoma	Localización postulada o vía de deficiencia de neurotransmisor dominante.
Motor	
Temblor	Globo pálido, DA
Rigidez	Mesocorticolímbica, DA
Bradicinesia	Nigroestriatal y mesolímbica, DA
Congelamiento	Locus coeruleus, NE
Inestabilidad postural	Globo pálido, DA Núcleo vestibular, ¿?
Mental	
Depresión	Núcleo rafé, 5-HT Locus coeruleus, NE
Bradifrenia	Mesocortical, DA Núcleo rafé, 5-HT
Demencia, anomia	Núcleo basalis, ACH Mesocortical, DA Locus coeruleus, NE Cortico hipocampal, somatostatina
Desórdenes del sueño	Núcleo rafé, 5-HT
Sensoriales	
Dolor y paresthesias	Diencéfaloespinal, DA
Autónomos	
Orthostasis, pérdida de peso, constipación, regulación térmica dañada, disfunción de esfínteres y sexual, seborrea.	Diencéfaloespinal, DA Hipotálamo, NE

DA, dopamina; NE, norepinefrina; ACH, acetilcolina; 5-HT, serotonina (Tomado de Jankovic, 1987).

Tomando como base el hecho de que el tratamiento más efectivo para mejorar la sintomatología de la enfermedad de Parkinson ha

sido la administración de L-Dihidroxifenilalanina (L-Dopa), que es un precursor de DA que atraviesa la barrera hematoencefálica (Quinn, 1987), se ha apoyado la idea de la participación del sistema nigroestriatal dopaminérgico en dicha enfermedad. Sin embargo, casi el 100% de los pacientes tratados presentan fluctuaciones en la ejecución motora y movimientos anormales involuntarios, después de 3 a 5 años de la administración de L-Dopa (Stocchi et al., 1989; Zigmond y Stricker, 1989).

D) El MPTP como modelo de la Enfermedad de Parkinson

"La validez de modelos animales siempre se cuestiona porque es difícil establecer una analogía de un modelo de enfermedad particular con su correspondiente condición en el humano. En el caso del Parkinsonismo inducido por MPTP estamos en la posición de afirmar con gran precisión que es un modelo altamente similar a la enfermedad de Parkinson desde un punto de vista clínico: En términos de hallazgos sintomatológicos y físicos los pacientes con Parkinsonismo inducido por MPTP son virtualmente idénticos a los pacientes con Parkinson idiopático, con excepción, por supuesto, de la edad"

Langston J. W. et al. 1986.

En 1983, Langston J. W. describió 4 casos de humanos jóvenes que presentaban una sintomatología similar a la de la enfermedad de Parkinson. Estos jóvenes, de 26 a 42 años, se habían administrado heroína que estaba contaminada con un análogo de meperidine (MPPP) y con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la cantidad calculada de MPTP que se administraron fue de 5 a 20 g. Poco tiempo después de su administración, los jóvenes comenzaron a presentar síntomas muy similares a los de un Parkinsonismo severo, tales como sacudidas de las extremidades, rigidez, lentitud generalizada, inmovilidad total, incremento del tono muscular y temblor de reposo, además de que se registró en ellos un decremento de los niveles de AHV en el líquido cefalorraquídeo. Estos individuos respondieron a la terapia con L-Dopa mejorando notablemente su estado. Un caso similar fue reportado anteriormente (Davis et al., 1979) en el se describe un humano que se administró cocaína contaminada con MPTP y posteriormente desarrolló

bradicinesia, rigidez, temblor y presentó niveles bajos de AHV en el líquido cefalorraquídeo; al realizar el análisis cerebral *post-mortem*, se encontró degeneración de la SNC y la presencia de "cuerpos de Lewy" en esta región (Kopin; 1986). Otro caso reportado fue el de un químico que trabajó durante 8 años con síntesis de compuestos que requerían la preparación repetida de MPTP; en este caso la absorción del compuesto se dió por vía cutánea y respiratoria y el sujeto también presentó una sintomatología similar a la enfermedad de Parkinson (Langston et al., 1983b).

Al realizar un análisis autorradiográfico en humanos, se ha observado que la mayor unión del MPTP se produce en el núcleo caudado, la SN, el locus coeruleus y la corteza cerebral (Javitch et al., 1984). También existen reportes de humanos que se administraron MPTP por vía intravenosa y que, contrario a los casos mencionados anteriormente, permanecieron asintomáticos, sin embargo, todos ellos mostraron una reducción de las terminales de la vía nigroestriatal, que se valoró como intermedia entre la cantidad presente en sujetos normales y la que se encuentra en sujetos con Parkinsonismo (Calne et al., 1985). Otro hallazgo adicional fue el de un humano con 10 meses de síntomas de Parkinson inducido por MPTP en el que se observó un aumento en el número de receptores a dopamina en el putamen (Perlmutter et al., 1987).

1.- Estudios realizados en primates

De manera similar a lo que ocurre en humanos, la administración sistémica de MPTP en varias especies de primates tales como *Macaca mulatta*, *Callithrix jacchus*, *Macaca fascicularis* y *Saimiri sciureus*, produce una variedad de déficits motores, entre los que se destacan rigidez, bradicinecia, pérdida de movimientos espontáneos, temblor de cabeza, cambios en tono muscular, postura flexionada, pérdida de expresión facial, temblor de baja amplitud y aumento en el tiempo de flexión y extensión de las extremidades (Burns et al., 1983; Jenner et al., 1984; Ueki et al., 1989). También se ha observado que la administración de L-Dopa mejora notablemente estos síntomas (Langston et al., 1984). De manera paralela a esta sintomatología, también se presentan diversas alteraciones neuronales, hay daño en la SNC y AVT, las células se vuelven picnóticas, y las neuronas que sobreviven muestran menos reactividad a TH y se ven "cuerpos de inclusión" en la SNC (Forno et al., 1986; Kitt et al., 1986). En el estriado también se observa una menor reactividad a TH y los niveles de DA disminuyen notablemente llegando hasta una cantidad menor de 10%, sin embargo, el globo pálido y putamen se afectan en menor grado. Asimismo, se observa un decremento en los niveles del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) en el cerebro medio, el estriado y el hipotálamo (Burns et al., 1983; Doudet et al., 1990). Otras estructuras cerebrales en las que también hay una reducción de neurotransmisores son el núcleo acumbens y la corteza, donde los

niveles de DA y DOPAC se reducen (Mitchell et. al., 1985). Por otra parte, se observa una disminución en el número de sitios de captura de dopamina en el núcleo caudado, putamen, SNC, AVT y tubérculo olfatorio (Alexander et al., 1992), además de que se presentan lesiones focales en el *locus coeruleus* (Forno et al., 1986).

En primates tratados con MPTP se observa un decremento del 26% en la concentración de la substancia P cortical, sin embargo no se detectan alteraciones en las encefalinas ni colecistoquinina (Jenner et al., 1986).

Un hallazgo interesante es que existe una susceptibilidad diferencial de los primates al MPTP, lo que se manifiesta por el hecho de que con la misma dosis de MPTP la intensidad del daño en el estriado, así como de los déficits motores, es variable (Moratalla et al., 1992). Esta susceptibilidad diferencial al MPTP también se observa a nivel de distintas regiones cerebrales, por ejemplo en el sistema de captura de DA y en la organización de parches-matriz del estriado. Los estriosomas sufren un efecto neurotóxico más lento que la matriz, y la pérdida de sitios de captura de monoaminas en el estriado sigue un gradiente lateral-medial, lo cual es muy similar al Parkinson idiopático (Kaufman y Madras, 1991); de la misma manera, se afecta más importantemente el putamen que el núcleo caudado (Moratalla et al., 1992).

De manera general se ha visto que la disminución de las concentraciones de dopamina estriatal en primates tratados con MPTP sistémico correlaciona positivamente con los déficits motores presentados por el animal. Cuando se presenta un Parkinsonismo

ligero el decremento de DA en el estriado es del 50 al 89%, cuando es de intensidad moderada el decremento es de 93% y cuando el animal presenta un Parkinsonismo severo, el decremento en los niveles de DA estriatal es de más del 98% (Alexander et al., 1992).

Al igual que el daño neuronal que se presenta en el Parkinson idiopático (Hirsch et al., 1988), el MPTP tiene un efecto neurotóxico directo sobre la neuromelanina de las neuronas dopaminérgicas de la SNc en primates (Levi et al., 1989).

Por otra parte, en estudios en los que se ha evaluado el metabolismo de glucosa en primates tratados con MPTP, se han observado alteraciones que se relacionan con el daño celular que se produce. Así, el consumo de glucosa disminuye en la SNc y aumenta en el globo pálido, caudado, putamen y núcleo pedunculopontino (Palombo et al., 1990). Sin embargo, otros estudios reportan un incremento en el consumo de glucosa en la SNc, globo pálido medial, tálamo, núcleo pedunculopontino y decremento en el núcleo caudado, putamen y núcleo subtalámico después de administrar MPTP por vía sistémica. De manera similar, otros autores describen que administrar el MPTP por vía intravenosa aumenta el consumo de glucosa en el núcleo caudado y putamen (Mitchell et al. 1989 ; Schwartzman y Alexander, 1985).

Diversos trabajos señalan que cuando se administra el MPTP en la arteria carótida, el MPP+ se retiene en varias regiones del cerebro, entre las que destacan los núcleos monoaminérgicos como el caudado, el putamen, la SNc, el *locus coeruleus*, el núcleo acumbens, el tubérculo olfatorio, el área preóptica, el hipotálamo,

la amígdala y el tálamo; sin embargo, el MPP+ no en todas las regiones tiene un efecto neurotóxico (Herkenham et al., 1991; Eface et al., 1990).

En estudios a más largo plazo de administración aguda sistémica de MPTP a primates se observa que un mes después todos los animales están severamente Parkinsónicos, y paralelamente existen pérdida neuronal, gliosis masiva en la SNC y gliosis ligera en el AVT, además de que el número de cuerpos reactivos a TH disminuye en la SNC y el estriado. Sin embargo, a los tres meses y medio se observa un cierto grado de recuperación motora y la TH aumenta en la SNC (Waters et al., 1987).

Diversos autores han reportado que existe cierto grado de recuperación motora en primates tiempo después de que se les han administrado dosis agudas o semiagudas de MPTP (Waters et al., 1987; Sandyk, 1988; Ueki et al., 1989; Russ et al., 1991). Debido a lo anterior, se ha sugerido que la administración de MPTP no es un buen modelo experimental de Parkinson, ya que, contrario a lo que sucede en primates, en los humanos que padecen esta enfermedad los síntomas se agravan a través del tiempo. Sin embargo, parece que estas diferencias se deben a un problema en las dosis utilizadas de MPTP, ya que si se administran dosis menores durante un período de tiempo mayor, de aproximadamente un año y medio, se induce un síndrome progresivo y con características motoras típicas del Parkinsonismo que perduran hasta dos años después, y estas alteraciones van acompañadas de una pérdida muy marcada de tinción de TH en estructuras como la SNC, el AVT, el caudado y el putamen

(Hantraye et al., 1993). Un síndrome progresivo de Parkinsonismo se observa también cuando se administra el MPTP bilateralmente en las arterias carótidas de los primates; los síntomas motores de Parkinsonismo se mantienen hasta después de un año de la infusión de la sustancia, tiempo al que se sacrificó a los animales (Smith et al., 1993).

2.- Estudios realizados en roedores

En general los roedores son refractarios a los efectos neurotóxicos del MPTP sistémico, aunque algunas especies de ratón son especialmente susceptibles (Hoskins y Davis, 1989), y si se administran elevadas cantidades del compuesto a ratas se observan algunos efectos similares. Sin embargo, existen datos contradictorios a este respecto (Boyce et al, 1984; Chieuh et al, 1984; Yamamoto y Kawana, 1991) y esta es la causa de que en modelos experimentales en roedores se inyecta el MPTP o MPP+ directamente en el cerebro (Bradbury et al, 1986; Sirinathsinghji et al, 1988; Lange, 1990; Harik et al, 1987; Heikkila et al, 1985; Chiueh et al, 1984; Gibb et al, 1988; Rollema et al, 1986; Hemrick-Luecke et al., 1992; Mitra et al., 1992). Algunas de las hipótesis para explicar esta falta de toxicidad mencionan que cuando se administra MPTP por vía intravenosa en la rata, el compuesto penetra la barrera hematoencefálica y se retiene en corteza, hipocampo, cerebelo y estriado, pero el tiempo que permanece en el cerebro es menor que

en primates, ya que pasa rápidamente a la circulación sanguínea periférica y esto parece ser una de las razones por las que el MPTP sistémico no causa mucho daño en roedores (Riachi et al., 1989). A pesar de ello, se ha reportado que una sola dosis aguda y varias dosis repetidas de MPTP sistémico en la rata producen un decremento en las concentraciones de DA y DOPAC en la SN y un aumento de los niveles de 5-HT en el núcleo del rafé y SN (Chiueh et al., 1984). Asimismo, cuando se administra el MPTP intraventricularmente en la rata, el compuesto es transformado a MPP+ y éste se retiene preferentemente en estructuras motoras como la división magnocelular del núcleo rojo, la SNc y el rafé dorsal. Sin embargo, sólo el MPP+ administrado directamente en el ventrículo produce decremento de DA en el estriado, tubérculo olfatorio y núcleo accumbens (Okada et al., 1989; Takada et al., 1991).

Por otro lado, se sabe que la administración intranigral de varias dosis de MPTP en la rata no causa decremento alguno en el contenido de DA de la SN ni cambios en el contenido de serotonina (Chiueh et al., 1984). Contrario a esto, la administración intranigral del MPP+ sí produce un daño en la SN y AVT (Gibb et al., 1988), así como reducción de DA, DOPAC, AHV y aumento del número de receptores D2 en el estriado (Bradbury et al., 1986; Lange, 1990), y disminución de los niveles de norepinefrina y serotonina en la corteza (Harik et al., 1987). Asimismo, cuando el MPP+ se administra unilateralmente en el haz del cerebro medio anterior también se produce un daño importante en la SN ipsilateral a la infusión, la reacción a TH se ve disminuída y no se detecta

liberación de DA en el estriado ipsilateral a la infusión (Sirinathsinghji et al., 1988; Beresford et al., 1988). Además, cuando el MPP+ se inyecta en el estriado disminuye drásticamente la liberación y los niveles de DA y sus metabolitos DOPAC, AHV y 5-HIAA (Heikkila et al, 1985; Santiago et al, 1991b).

Otros autores han reportado que la administración intraestriatal del MPTP, y principalmente del MPP+, producen una liberación masiva de DA y una disminución en la liberación de los metabolitos DOPAC, AHV y 5-HIAA antes de inducir una degeneración neuronal, que se deben a una destrucción de las terminales dopaminérgicas en donde el efecto es irreversible (Rollema et al, 1986; Ozaki et al, 1987; Rollema et al, 1988; Ballarin et al., 1989; Miyake y Chiueh 1989). De manera similar, cuando se administra MPP+ en la SN aumenta la liberación de DA en la SN y disminuye en el estriado ipsilateral (Santiago et al., 1991a).

Al igual que en los primates, los roedores presentan alteraciones motoras como resultado de la administración de MPTP. En este caso, los déficits motores que se producen en ratas cuando se administran dosis altas de MPTP sistémicamente son ataxia, temblor, rigidez, inmovilidad, movimientos clónicos de las extremidades y convulsiones (Chiueh et al, 1984; Yamamoto y Kawana, 1991). De manera similar, cuando se administra MPTP o MPP+ unilateralmente en la SN de la rata se produce una conducta conocida como conducta de giro, en la que el animal tiene un movimiento activo en una dirección circular (Sirinasthsinghji, 1985; Lange, 1989; Lange, 1990). Otro tipo de alteraciones se

observan cuando el MPP+ se administra bilateralmente en la SN, en este caso se produce una reducción en la locomoción, pérdida en la coordinación de movimientos y rigidez (Bradbury et al, 1986).

Todos los cambios conductuales mencionados anteriormente se han correlacionado con el daño que el MPTP y el MPP+ producen en ciertas estructuras relacionadas con el sistema motor, como el estriado y la SN, (Gibb et al., 1988; Santiago et al., 1991), por lo que la administración de MPTP y MPP+ intracerebral se ha sugerido como un buen modelo experimental en roedores de la enfermedad de Parkinson, al igual que el modelo con 6-hidroxidopamina, donde se lesiona de manera específica la vía nigroestriatal dopaminérgica (Ungerstedt, 1971).

E) Mecanismo de acción del MPTP

Cuando se administra el MPTP sistémicamente a primates el compuesto atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica gracias a su naturaleza liposoluble (Riachi et al, 1989). De esta manera es capaz de llegar al cerebro en donde es transformado por la enzima monoaminoxidasa tipo B (MAO-B), que se localiza preferencialmente en la glía y los sistemas serotoninérgicos (Levitt et al., 1982), y que se encarga de metabolizarlo a un compuesto intermediario conocido como 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina (MPDP+), el cual es muy inestable y rápidamente se oxida formando el ión MPP+ (Fig. 3) (Castagnoli et al., 1985; Di Monte et al., 1992).

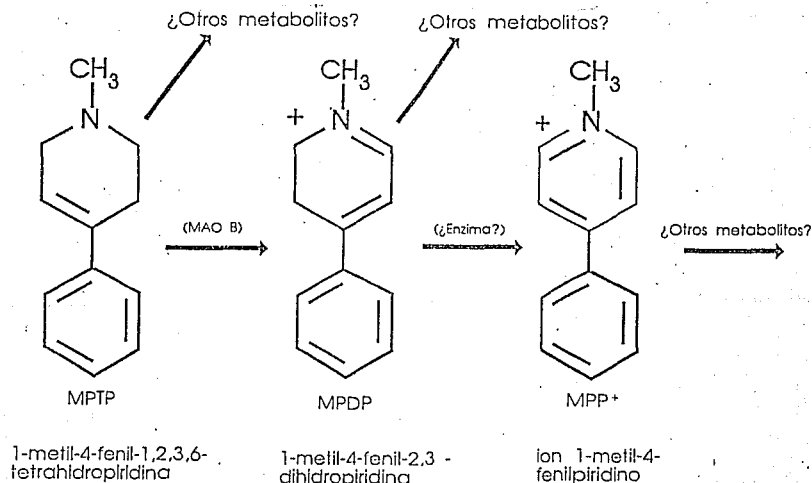


Figura 4. Conversión del MPTP a MPDP+ y a MPP+ (Modificado de Langston, 1985)

El MPP+ se almacena principalmente en los sistemas dopaminérgicos (Irwin y Langston, 1985) debido a su gran afinidad por el sistema de recaptura de DA (Mayer et al., 1986) y, una vez que se localiza dentro de las neuronas dopaminérgicas, se une con gran afinidad a la neuromelanina, la cual sirve como un depósito gradual de su liberación (Fig. 5) (D'Amato et al., 1986).

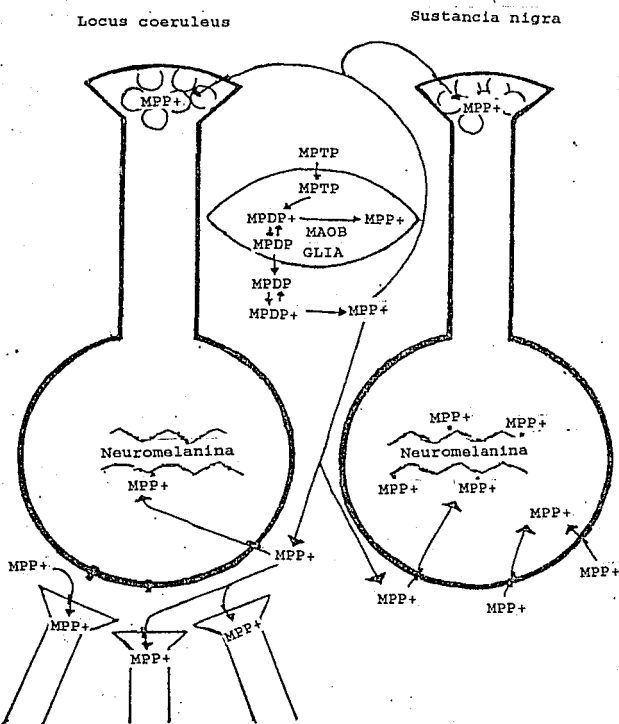


Figura 5. Metabolismo del MPTP. Monoaminoxidasa B (MAOB), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina (MPDP+), ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) (Modificado de D'Amato et al., 1986).

Para explicar la muerte neuronal inducida por el MPP+ se ha propuesto que en el interior celular el compuesto se transporta a las mitocondrias por un sistema dependiente de energía (Ramsay et al., 1986), en donde se almacena e inhibe la actividad de la NADH oxidasa (un mecanismo que podría estar mediado por la generación de radicales libres) (Hasegawa et al., 1990; Cleeter et al., 1992), causando interrupción la cadena respiratoria a nivel del complejo I (Fig. 6) (Mizuno et al., 1987a), y por consiguiente impidiendo la oxidación de sustratos ligados a la NADH y dando lugar a una reducción en la síntesis de ATP (Di Monte et al., 1986; Mizuno et al., 1987b) y a un subsecuente desbalance energético, todo lo cual conllevaría a la muerte neuronal. Esta hipótesis de daño a nivel mitocondrial inducido por el MPP+, está apoyada por el hecho de que en el Parkinson idiopático hay daño mitocondrial en el estriado (Ikebe et al., 1990), además de que se encuentra deficiencia en la actividad de la NADH en la SN (Schapira et al., 1990).

El desbalance energético mitocondrial inducido por el MPP+ se ha relacionado con los receptores a glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Estos receptores permiten el paso de concentraciones elevadas de calcio al interior celular, lo que podría dar lugar a un aumento importante de calcio mitocondrial que resultaría en la muerte neuronal (Beal et al., 1993). De igual manera, también se le ha atribuído un papel al aumento de calcio intracelular en la toxicidad producida por MPTP (Iacopino et al., 1992). Sin embargo, es importante mencionar que la relación entre el daño neuronal producido por el MPP+ y la participación de los

receptores tipo NMDA no está muy clara (Turski et al., 1991; Sonsalla et al., 1992; Kupsch et al., 1992), y se requieren estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

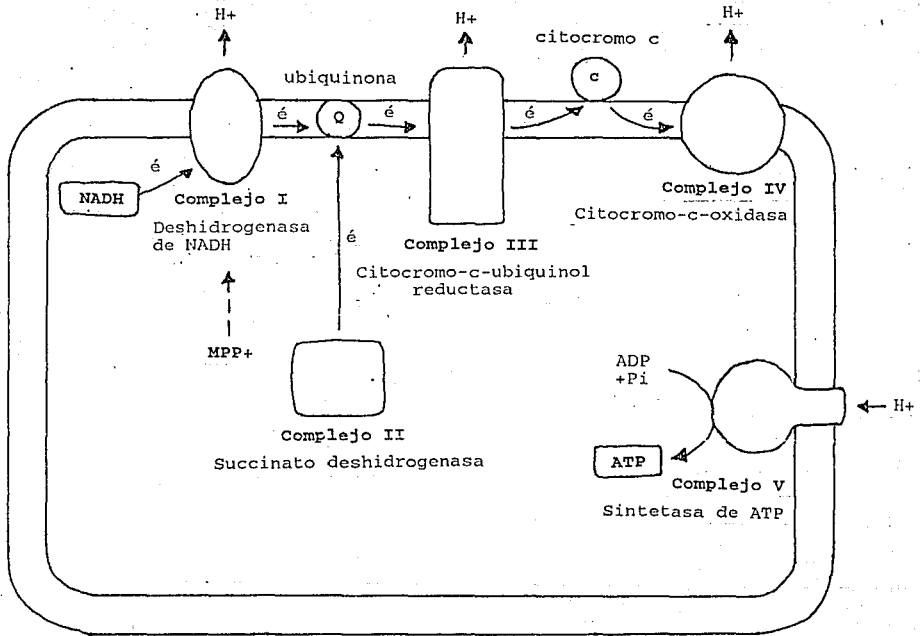


Figura 6. Acción del MPP+ a nivel de la cadena respiratoria. Dinucleótido nicotinamida y de adenina reducido (NADH), electrón (é), ión hidrógeno (H+), Difosfato de adenosina (ADP), Trifosfato de adenosina (ATP), Fósforo inorgánico (Pi), ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+). (Modificado de Beal et al., 1993).

Se sabe que el MPTP y el MPP+ pueden inducir la formación de radicales libres (Hadjiconstantinou et al., 1987), los cuales pudieran provocar la muerte celular; sin embargo, el daño producido por el MPP+ no se previene por antioxidantes (Sanchez-Ramos et al., 1988). Cuando se administran inhibidores de la recaptura de DA se protege a las neuronas del daño, lo cual hablaría más bien de un mecanismo directamente ligado a las neuronas dopaminérgicas.

F) Neurotoxicidad selectiva del MPTP

Diversos autores han concluido que el MPTP causa un daño selectivo a las neuronas dopaminérgicas (Heikkila et al., 1985; Sanchez-Ramos et al., 1988; Mytilineou et al., 1985) debido a su mecanismo de acción específico para dañar dichas células. Sin embargo, también se ha visto que ésta neurotoxina altera otros sistemas de neurotransmisores. Así por ejemplo, se ha reportado que la administración sistémica de MPTP en primates provoca un decremento en las concentraciones de la serotonina en estriado, núcleo acumbens, hipotálamo, septum, amígdala, corteza frontal y corteza cingulada, y provoca alteraciones en la regulación del receptor GABA_A a nivel del globo pálido lateral (Pérez-Ontaño et al., 1991; Robertson et al., 1990).

Asimismo, al inyectar el MPP⁺ intranigralmente en la rata, se produce una disminución de los niveles serotonina y de norepinefrina en la corteza cingulada; al administrarlo en el *locus coeruleus* disminuyen las concentraciones de norepinefrina en la corteza cingulada y núcleo acumbens y cuando se administra en el núcleo medial del *rafé* provoca un decremento en los niveles de serotonina en estructuras como el estriado, corteza cingulada y bulbo olfatorio (Namura et al., 1987). Otras evidencias que señalan la inespecificidad de la droga surgen debido a que la infusión de MPTP en el haz del cerebro medio daña de manera importante la proyección serotoninérgica que va del estriado al núcleo *rafé* dorsal (Takada et al., 1987), también disminuye la concentración de

GABA en la SN (Altar et al., 1986) y, en menor medida, la concentración de GABA en el estriado (Heikkila et al., 1985).

Datos similares derivan de experimentos en los que se ha visto que la administración intraperitoneal de MPTP en la rata reduce el metabolismo de serotonina en el hipotálamo, corteza e hipocampo y acelera el metabolismo de norepinefrina en la corteza cerebral (Enz et al., 1984). Asimismo, cuando se administra MPTP sistémicamente en ratón, se observa una pequeña disminución de norepinefrina en el estriado y aumento de la concentración de somatostatina en la corteza frontal (Mitsuo y Schwartz, 1992), además disminuyen los niveles de GABA, cambia la regulación del receptor GABA_A en la SN y disminuyen los niveles de norepinefrina en el locus coeruleus, hipocampo y SN (Hu et al., 1991; Kuriyama et al., 1990).

Paralelamente a estos datos *in vivo*, algunos experimentos realizados *in vitro* también apoyan la idea de que el MPTP produce un daño neuronal inespecífico. Por ejemplo, en cultivos de neuronas serotoninérgicas, el MPP+ tiene un efecto neurotóxico directo, aunque las concentraciones que se requieren son mayores que para dañar cultivos de neuronas dopaminérgicas (Friedman y Mytilineou, 1990). También se ha visto que el MPP+ es altamente neurotóxico en los cultivos de células granulares glutamatérgicas de cerebelo, de tal manera que este daño se puede prevenir cuando se adiciona al medio un inhibidor competitivo de la captura de glutamato o cuando se administran dosis subtóxicas de NMDA o glutamato en las células granulares antes de administrar el MPP+ (Marini et al., 1989; 1992).

III - OBJETIVOS

Como se mencionó en los antecedentes, existen diversas evidencias que apoyan la idea de que el MPP+ no lesiona selectivamente a las neuronas dopaminérgicas, sino que puede tener un efecto inespecífico sobre otras poblaciones neuronales. Debido a lo anterior, es interesante determinar en qué otros sistemas de neurotransmisores el MPP+ también ejerce estos efectos neurotóxicos. Como un ejemplo para valorar otros sistemas de neurotransmisores, las células GABAérgicas de la SNr resultan de especial interés ya que participan de manera fundamental en la información de salida de los ganglios basales y su alteración provoca efectos motores muy evidentes.

Puesto que no existen muchos estudios que determinen la acción del MPP+ sobre las células GABAérgicas, el primer objetivo del presente estudio fue estudiar los efectos motores que produce la administración de concentraciones variadas de MPP+ en la SNr de ratas. Por otra parte, puesto que se sabe que en la SNr existe una interrelación importante entre las dendritas de las neuronas dopaminérgicas de la SNC y las terminales de las neuronas GABAérgicas de la vía estriatonigral (estas últimas presentan receptores dopaminérgicos del tipo D1), se evaluaron las modificaciones conductuales producidas al administrar por vía intraperitoneal la nomifensina, un inhibidor del sistema de recaptura de dopamina, en ratas inyectadas con MPP+ en la SNr.

Un objetivo adicional fue el de evaluar el efecto neurotóxico que el MPP+ tiene sobre las neuronas GABAérgicas y dopaminérgicas de la SN. En este caso, se administran dosis variadas de MPP+ en la SNr de las ratas; la toxicidad se evaluó por medio de histología y midiendo con técnicas radiométricas la actividad de la GAD de la SNr. Además se utilizaron técnicas de Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para cuantificar los niveles de aminoácidos en la SN inyectada y contralateral, y los niveles de DA en el estriado ipsilateral y contralateral a la inyección.

El último objetivo fue determinar en experimentos *in vitro*, un posible efecto del MPP+ sobre la actividad enzimática de la GAD, la CAT y la LDH.

IV - MATERIAL Y METODOS

Animales. En todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho (190-200 gr).

Inyeccion estereotáxica. Se anestesió a las ratas con vapor halotano con oxígeno, y se les practicó una incisión en el cráneo para dejar al descubierto las suturas y el bregma. Las inyecciones se realizaron en la SNr, y se tomaron las coordenadas de acuerdo al Atlas Estereotáxico de Köning y Klippel (1963) (-5.2 AP, -2.0 L y -7.8 V). El MPP+ (como ioduro, Research Biochemical Incorporated, Natick, MA, U.S.A.) se disolvió en agua y se inyectó con una jeringa Hamilton de 0.5 μ l. Las concentraciones administradas fueron 1, 3, 6 ó 10 μ g/0.25 μ l en 1 min; después de que este finalizó se dejó la aguja 5 min en la misma posición para que la droga difundiera, posteriormente la jeringa fue retirada y se procedió a suturar a los animales y se retiró la anestesia.

Evaluación conductual. Después de administrar el MPP+ los animales fueron colocados en una caja que permitiera filmar las conductas mostradas. Dicha filmación se realizó durante 6 horas posteriores a la inyección, y durante una hora 24 horas después de la administración del compuesto.

Administración de nomifensina. La 1,2,3,4-Tetrahydro-2-methyl-4-phenyl-8-isoquinolinamine maleate (Nomifensine maleate) (Research Biochemical Incorporated, Natick, MA, U.S.A.), se disolvió en agua y se administraron 25 mg/kg intraperitonealmente 30 min antes de la inyección intranigral de 10 µg/0.25 µl de MPP+.

Niveles de aminoácidos. Para cuantificar los niveles de aminoácidos encontrados después de la administración del MPTP, se utilizó la técnica de Fluorescencia por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) (Camacho-Arroyo y Tapia, 1992). La fase móvil que se utilizó fue de acetato de potasio 0.1 M, pH final 5.5 y metanol. Los aminoácidos se detectaron por medio de una reacción de fluorescencia con una solución de ortoftaldialdehído (OPA) (5 mg OPA, 250 µl Etanol, 4.5 ml de Acido Bórico y 250 µl de β-mercaptoetanol). Estas mediciones se realizaron 24 horas después de la inyección de 6 µg/0.25 µl de MPP+ en la SN inyectada, la SN contralateral y la SN de animales sin ningún tratamiento. Para realizar esta cuantificación, lo que se hizo fue disectar la SN, homogenizarla en 100 µl de H₂O a una concentración final de ácido perclórico de 1.4 N, en la que se dejó disolver por 12 horas para posteriormente centrifugar a 5000 revoluciones por minuto (rpm) por 3 min, después de ello se tomó el sobrenadante y se neutralizó con KOH 10 N, nuevamente se volvió a centrifugar a 5000 rpm por 3 min, después de esto se tomó el sobrenadante y se inyectaron 25 µl al HPLC mezclados con 25 µl de la mezcla de OPA.

Niveles de DA. Los niveles de DA se determinaron por medio de detección electroquímica por HPLC (Duran et al., 1985). La fase móvil que se utilizó fue Acetato de sodio 0.1 M con Acido etilendiamino-tetracético (EDTA) 1mM y 1% de ácido acético glacial pH 4.0, y Metanol. El potencial de detección fue de 800 milivolts. Se utilizaron animales que se les administró 10 µg/ 0.25 µl en la SNr y que se decapitaron 24 y 72 horas después de la inyección. Posterior al sacrificio del animal, se extrajo el cerebro y se disectó el estriado, se pesó y se homogenizó en ácido perclórico 0.1 M con EDTA 1mM, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min, y se tomó el sobrenadante para pasarlo a través de un filtro Millipore y el filtrado final se pasó por el HPLC.

Histología. Para la realización de las técnicas histológicas, a diversos animales se les administraron diferentes dosis (1, 3, 6 y 10 µg/ 0.25 µl) de MPP+ en la SNr. 24 horas después de la inyección, el animal fue anestesiado y perfundido a través del ventrículo izquierdo del corazón, primero con solución salina al 1% y posteriormente con formol al 10%. Se disectó el cerebro, se embebió en parafina y se realizaron cortes de 40 µm para teñirlos con la técnica de Kluver Barrera.

Actividad de la GAD en animales inyectados con MPP+ intranigral. Se inyectó a diferentes animales con dosis variadas de MPP+ (1, 3, 6 y 10 µg/0.25 µl) en la SNr, y posteriormente se decapitaron a las 24 horas, se disectó la SN y se homogenizó en 200

µl de agua. La actividad de la GAD se determinó de acuerdo a un método radiométrico previamente reportado (López-García et al., 1990). En tubos de vidrio pequeños (2 cm x 0.5 cm aproximadamente) se colocaron 29 µl de buffer de fosfatos 50 mM pH 6.4 (que contenía ditiotreititol 13 mM), 8 µl de [1-¹⁴C]-L-glutamic acid (actividad específica 46 mCi/ mmol, NEN-Dupont, Boston, Ma, U.S.A.), en presencia o ausencia de PLP 0.5 mM. Para iniciar la reacción se añadieron 25 µl del homogenado del tejido y, por medio de una manguera de hule, se conectó ese tubo a uno contiguo que contenía 25 µl de hidróxido de hiamina, y ambos se colocaron en un baño de incubación a 37 °C por 20 min, después de los cuales se detuvo la reacción agregando H₂SO₄ 2N; a los tubos que sirvieron como blanco se les añadió el H₂SO₄ desde el principio. Con la técnica mencionada se consiguió que el CO₂ que se desprendió del glutámico gracias a la actividad de la GAD se atrapó en la hiamina. Después de detener la reacción, los tubos permanecieron en incubación 1 hora para asegurar que todo el CO₂ desprendido pasara al tubo que contenía la hiamina. Después de este tiempo, el tubo que contenía el CO₂ atrapado en la hiamina se colocó en viales de 10 ml; a estos viales se les añadieron 7 ml de una mezcla de líquido de centelleo que se preparó disolviendo 5 g de 2,5-difeniloxazole y 100 mg de 1,4-bis(2-(5-feniloxazolili)-benceno en 1 lt de tolueno, y por último se colocaron en un contador de radiactividad para muestras líquidas.

Actividad de la GAD agregando el MPP+ in vitro. Se disectaron SN de animales sin ningún tratamiento, la SN se homogenizó en 200 µl de agua y se siguió el mismo protocolo de medición de la actividad de la GAD para animales inyectados con MPP+, sólo que en este caso el buffer de incubación contenía diferentes concentraciones de MPP+ en los 70 µl de la mezcla total de incubación. Las concentraciones utilizadas de MPP+ fueron 4, 10, 16.5, 33.3 y 55.8 mM y éstas se eligieron tomando como referencia las concentraciones que se administraron en los experimentos *in vivo* (Tabla 3). También se determinó la actividad de la GAD en homogenados de estriados de ratas sin ningún tratamiento añadiendo 33.3 mM de MPP+ y que se homogenizaron en 350 µl de agua.

TABLA 3. Comparación de las dosis utilizadas de MPP+ en los experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Cantidad inyectada de MPP+ en la SNr	Concentración mM de MPP+ equivalente a la cantidad inyectada	Concentración mM de MPP+ que se añadió en los experimentos <i>in vitro</i> (actividad enzimática que se determinó)
1 ug/ 0.25 ul	13.5	4 (GAD) 16.5 (GAD) 33.3 (GAD, CAT, LDH)
3 ug/ 0.25 ul	40.4	55.8 (GAD)
6 ug/ 0.25 ul	80.8	
10 ug/ 0.25 ul	134.6	

Cinética de la actividad de la GAD agregando el MPP+ in vitro.

En este caso se disectó la SN de animales sin ningún tratamiento previo, y se homogenizó en 200 μ l de agua. Para llevar a cabo la reacción de la GAD se añadieron diferentes concentraciones de ácido glutámico (0.5, 1, 5, 10 y 20 mM); todas las reacciones se llevaron a cabo con presencia de PLP y la cinética de la GAD se evaluó en presencia de dos concentraciones de MPP+ (10 mM y 33.3 mM) en el buffer de incubación. Se siguió el mismo protocolo para la medición de la GAD que para los animales inyectados con MPP+.

Determinación de la actividad de la CAT añadiendo el MPP+ in vitro.

La actividad de la CAT se determinó por un método modificado de Fonnum (1975). Se disectaron los estriados y SN de ratas sin ningún tratamiento previo, y se pesaron y homogenizaron en 25 volúmenes de agua. La reacción se llevó a cabo por incubación en tubos de vidrio (5 x 0.5 cm aproximadamente), que contenían NaCl 300 mM, buffer de fosfatos 41 mM, pH 7.4, eserina 0.1 mM disuelta en EDTA 10 mM, Cloruro de colina 10 mM, Tritón X-100 al 0.05% y Acetyl Coenzyme A, (Acetyl-³H) 0.2 mM (actividad específica 5-15 Ci/mmol, ICN, Ca, U.S.A.). En los experimentos donde se añadió el MPP+, éste se agregó en la mezcla de incubación en una concentración final de 33.3 mM. A esta mezcla de incubación se le añadió 84 μ l del homogenado de tejido y se dejó incubando por 20 min a 37 °C, después de los cuales se detuvo la reacción agregando 5 ml de buffer de fosfatos 10 mM pH 7.4, y posteriormente se añadieron 2 ml de una mezcla de acetonitrilo y 10 mg de

tetrafenilborato de sodio. Al final se añadieron 10 ml de mezcla de líquido de centelleo (5 g de 2,5-difeniloxazole y 100 mg de 1,4-bis(2-(5-feniloxazolil))-benceno en 1 lt de tolueno; como resultado de esta mezcla se formaron dos fases de diferente densidad, una orgánica y otra inorgánica, de tal manera que la acetilcolina que se sintetizó en la fase inorgánica migró a la fase orgánica. Posteriormente las muestras se colocaron en un contador de centelleo para muestras líquidas.

Determinación de la actividad de la LDH poniendo el MPP+ in vitro. La LDH se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico de Reeves et al. (1966). Se disectaron estriados y SN de ratas sin ningún tratamiento y se homogenizaron en 20 vol de agua, y después el homogenado se diluyó a la mitad. La reacción se midió a 340 nm de absorbancia en un espectrofotómetro. La mezcla de reacción contenía 920 μ l de buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.5, 20 μ l de NADH 170 μ M, 40 μ l del homogenado de estriado o SN y se añadieron 20 μ l de piruvato de sodio 0.3 mM para iniciar la reacción. La actividad de la enzima se evaluó por el decaimiento en la absorbancia que se dió durante un minuto inmediatamente después de haber añadido el piruvato de sodio. El MPP+ se añadió en el buffer de fosfatos para tener una concentración final de 33.3 mM.

Determinación de proteína. La proteína se determinó en los homogenados de tejido por el método de Lowry et al. (1951).

Estadística. Para la actividad de la GAD, CAT, LDH y los niveles de aminoácidos se utilizó la prueba estadística de ANOVA de un vía, con la prueba de Fischer. En el caso de la evaluación conductual y los niveles de DA se utilizó prueba de T-Student no pareada.

V - RESULTADOS

A) Alteraciones conductuales inducidas por la administración intranigral de MPP+.

La administración unilateral de MPP+ en la SNr produjo conducta de giro contralateral al sitio de inyección de la droga. El desencadenamiento de esta conducta fue dosis dependiente (Fig. 7), lo cual se observó porque la administración de 1 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ de MPP+ no produjo ninguna conducta aparente (el dato no se muestra); sin embargo a partir de los 3 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ de MPP+ se cuantificó un total de 42 ± 11 (M \pm EE, n = 7) giros en la primera hora y aumentó en las siguientes 5 horas, llegando a alcanzar un máximo de 240 ± 94 (M \pm EE, n = 7) en la tercera hora, para después decrementar hasta 81 ± 47 (M \pm EE, n = 7) a la sexta hora. Dosis mayores (6 μg y 10 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$) produjeron un número de giros similar; en la primera hora fue aproximadamente de 200 con ambas dosis y hasta las 5 horas se mantuvo alrededor de 400 giros/h; en la sexta hora el número de giros/h producidos por 6 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ de MPP+ disminuyó a 255 ± 57 (M \pm EE, n = 7), y con la dosis de 10 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ se mantuvo alrededor de 400 giros/h (Fig. 7).

A las 24 horas después de la administración del MPP+ en la SNr, el número de giros contralaterales por hora aumentó con las tres dosis usadas, con 3 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ fue de 246 ± 145 (M \pm EE, n = 6), con 6 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ fue de 574 ± 116 (M \pm EE, n = 6) y con la

dosis de 10 μg / 0.25 μl fue de 686 ± 130 ($M \pm EE$, $n = 9$) (Fig. 7).

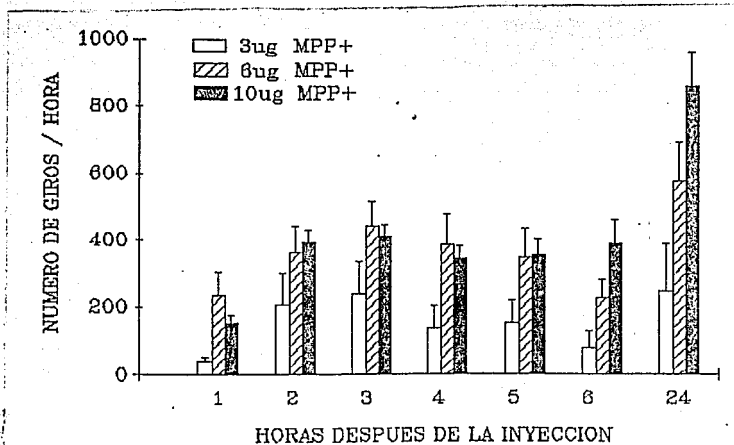


Figura 7. Conducta de giro contralateral inducida por la inyección intranigral de MPP+; las dosis usadas fueron 3, 6 y 10 μg / 0.25 μl . La conducta se muestra 6 horas seguidas a la inyección y 1 hora a las 24 horas después. Las barras representan $M \pm EE$ ($n = 7-27$).

B) Modificación por Nomifensina de las alteraciones conductuales inducidas por la administración de MPP+ intranigral.

Al administrar la Nomifensina (inhibidor de la recaptura de DA (Jonsson et al., 1986)), por vía intraperitoneal, la conducta de giro contralateral inducida por 10 μg / 0.25 μl de MPP+ se abatió completamente en la primera hora (Fig. 8). El número de giros fue de 119 ± 25 ($M \pm EE$, $n = 4$) en la primera hora en el control, y sólo 2 ± 1 ($M \pm EE$, $n = 8$) en las ratas que recibieron previamente

nomifensina ($p < 0.0005$). En la segunda hora el decremento fue menor aunque persistió, ya que de 249 ± 55 giros ($M \pm ES$, $n = 4$), de las ratas tratadas solo con MPP+ se redujo a 99 ± 32 ($M \pm ES$, $n = 8$) en los animales que tenían nomifensina ($p < 0.05$). De 3 horas en adelante no hubo diferencias conductuales entre el grupo control y el que recibió nomifensina (Fig. 8).

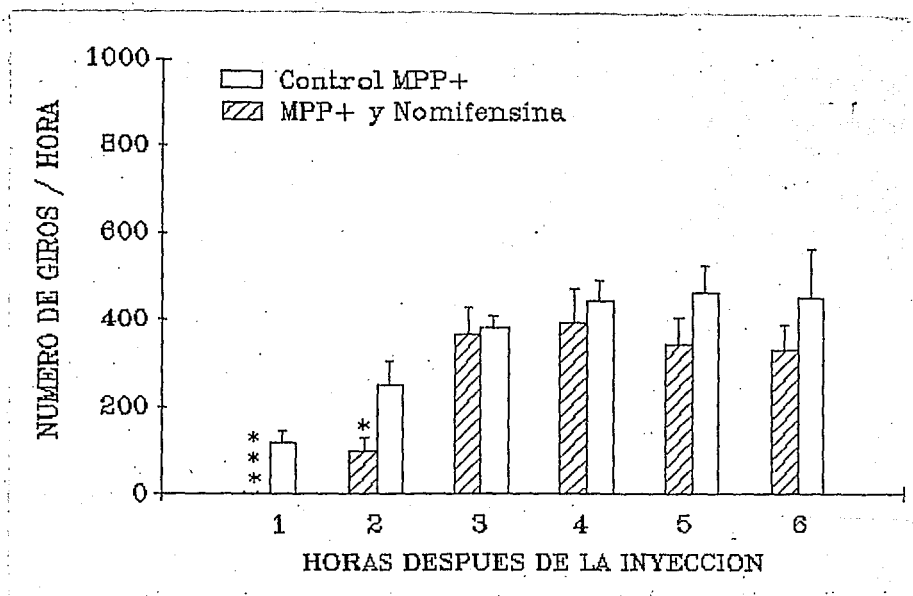
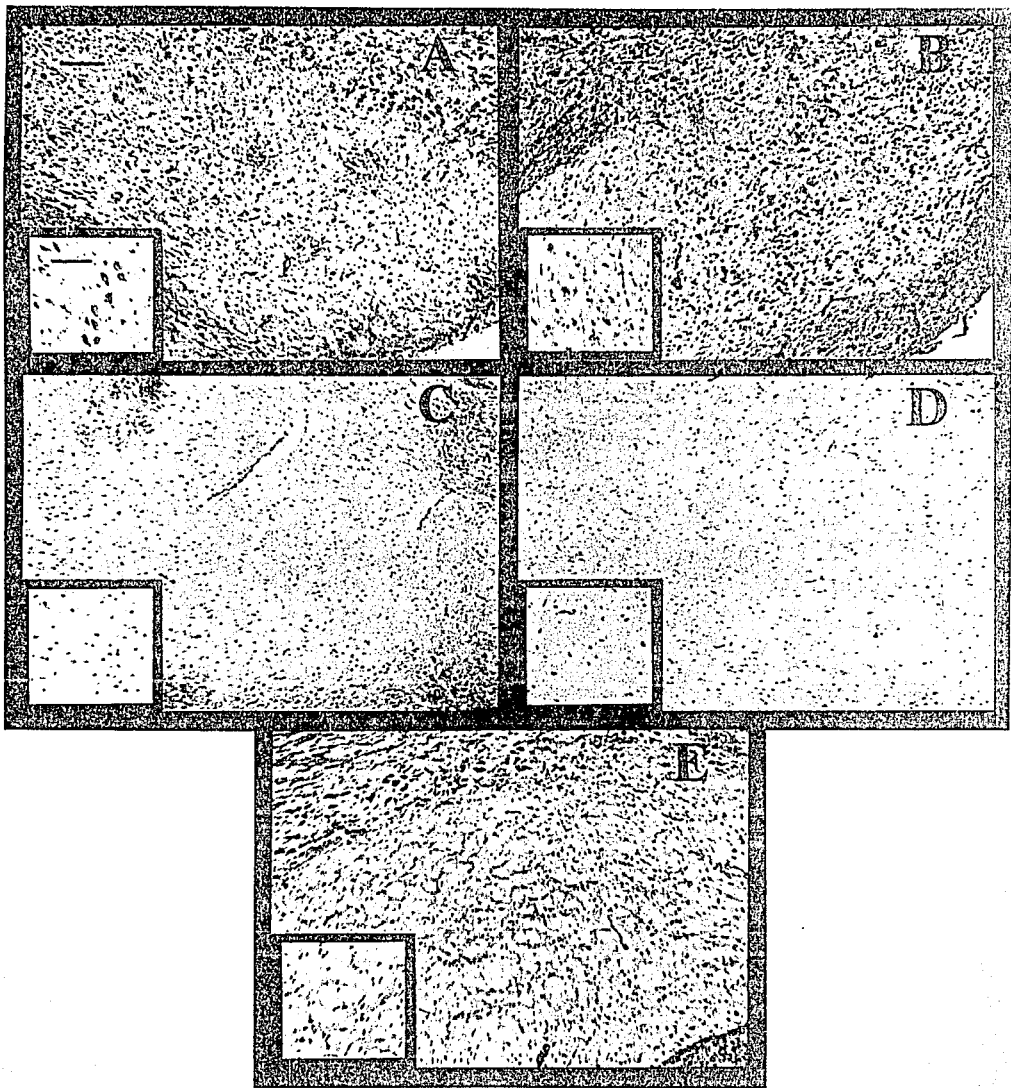


Figura 8. Efecto de la administración de 25 mg/kg de Nomifensina intraperitoneal 30 minutos antes de la administración intranigral de MPP+ 10 μ g/ 0.25 μ l. Los valores representan $M \pm EE$. Las barras blancas representan el control y las barras rayadas el pretratamiento con nomifensina ($n = 4-8$) (* $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$).

C) Alteraciones histológicas producidas por la administración intranigral de MPP+ en la sustancia nigra de la rata.

Después de inyectar el MPP+ en la SNr no se observaron diferencias entre la SNr control y la SNr a la que se le administró 1 μ g de MPP+ (Fig. 9, a y b). Sin embargo, cuando se emplearon dosis más altas de MPP+ (3, 6 y 10 μ g) se observó lesión en el sitio de inyección, que fue mayor con las dosis más altas de MPP+ utilizadas (Fig. 9 c, d y e), la lesión se caracterizó por la presencia de células picnóticas y un material fibroso que podría ser de origen glial, el cual fue más evidente cuando se administraron 10 μ g de MPP+ (Fig. 9e).

Figura 9. Histología de la SNr 24 horas después de la administración de diferentes dosis de MPP+. A) Control, B) 1 μ g de MPP+ en donde no existe diferencia con el control, C) 3 μ g de MPP+, D) 6 μ g de MPP+. En C y D se observan los somas neuronales contraídos y E) 10 μ g de MPP+ se hace evidente la presencia de un material fibroso. Las barras mostradas en A indican 114 μ m en la foto superior y 72 μ m en el recuadro.



D) Actividad enzimática de la GAD de la sustancia nigra después de la administración de MPP+ intranigral.

Al hacer la cuantificación 24 horas después de la administración de 1 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ de MPP+ en la SNr no se observaron cambios en la actividad de la GAD (Fig. 11). Sin embargo, al inyectar una dosis de 3 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ de MPP+ intranigral la actividad de esta enzima disminuyó aproximadamente un 40% respecto al control ($p < 0.001$) (Fig. 10). De la misma manera, al administrar 6 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ la actividad disminuyó a 70% ($p < 0.001$), y con una dosis aún mayor de 10 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ el decremento fue de aproximadamente 90% con respecto al control ($p < 0.001$). Es importante notar que estos cambios se observaron tanto en presencia como en ausencia de PLP (Figs. 10 y 11).

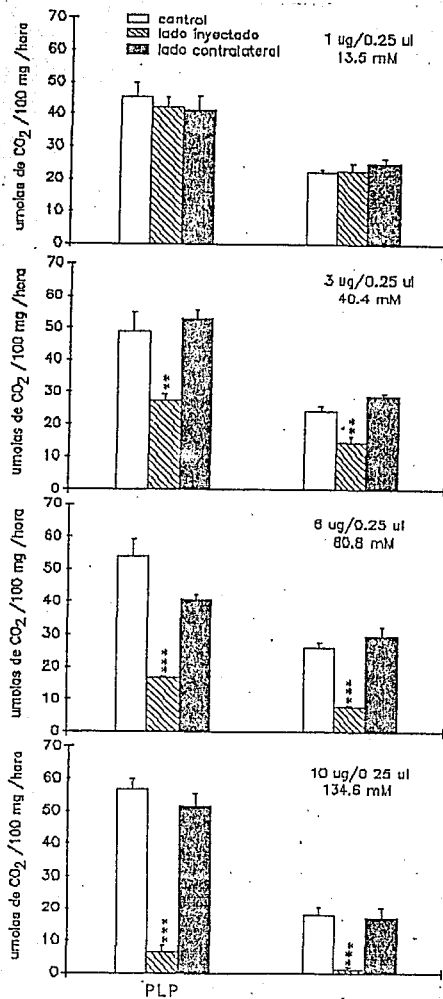


Figura 10. Actividad de la GAD en SN, 24 horas después de la administración intranigral de MPP+ (1, 3, 6 y 10 μg /0.25 μl). Los valores representan $M \pm EE$. Las barras blancas representan SN de ratas sin ningún tratamiento, las barras rayadas representan las SN inyectadas y las barras negras representan la SN contralateral al lado inyectado ($n = 4-9$) (***) $p < 0.001$.

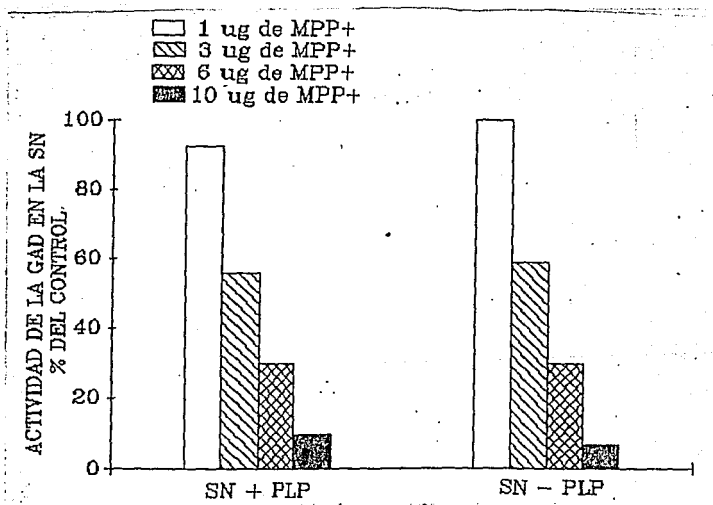


Figura 11. Disminución en la actividad enzimática de la GAD, producido por la administración intranigral de MPP+ (1, 3, 6 y 10 μg / 0.25 μl). Los valores están representados como por ciento respecto al control.

E) Cuantificación de los niveles de aminoácidos 24 horas después de la administración intranigral de MPP+.

Al hacer esta medición, se observó que los niveles de aspártico, glutámico, glicina, taurina y alanina no se modificaron en la SN a la que se le administró el MPP+ ni en la SN contralateral con respecto a los controles. Por el contrario, los niveles de GABA tuvieron un decremento de aproximadamente el 33% en la SN inyectada con respecto al control ($p < 0.005$) (Fig. 12).

F) Cuantificación de los niveles de dopamina estriatal en ratas que se les administró MPP+ intranigral.

La administración de MPP+ 10 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ en la SNr, produjo disminución del nivel de DA en el estriado ipsilateral al hemisferio cerebral inyectado a las 72 horas después de haber administrado la droga; el decremento observado fue de aproximadamente un 70% respecto al control ($p < 0.0005$) (Fig. 13). Sin embargo, es importante hacer notar que a las 24 horas no se observó cambio alguno (Fig. 13).

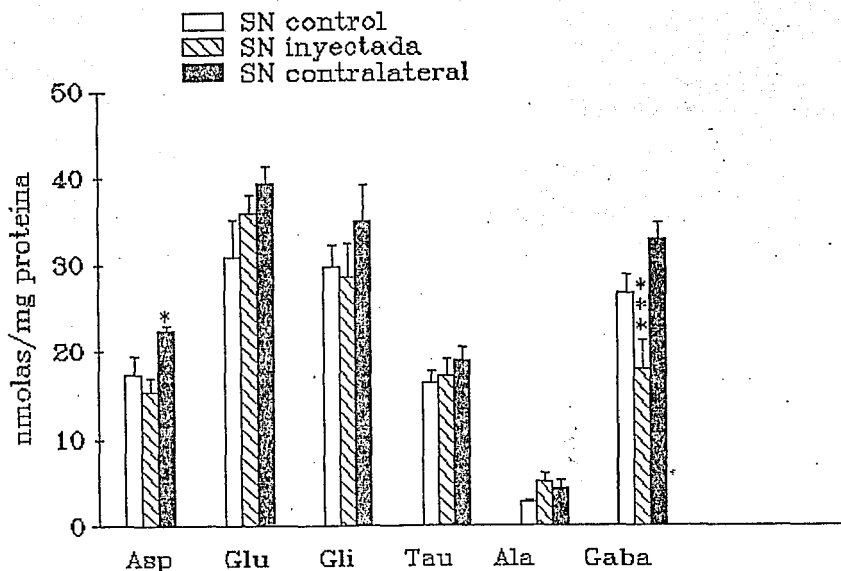


Figura 12. Cuantificación de los niveles de aminoácidos expresados en nmol/mg proteína en SN medidos 24 horas después de la administración intranigral de 6 $\mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ de MPP+. Las barras representan $M \pm EE$. Las barras blancas representan SN de ratas sin ningún tratamiento, las barras rayadas representan las SN inyectadas y las barras negras representan la SN contralateral al lado inyectado (n = 7 - 9) (* p < 0.05, ** p < 0.005). Asp-Aspártico, Glu-Glutámico, Gli-Glicina, Tau-Taurina, Ala-Alanina.

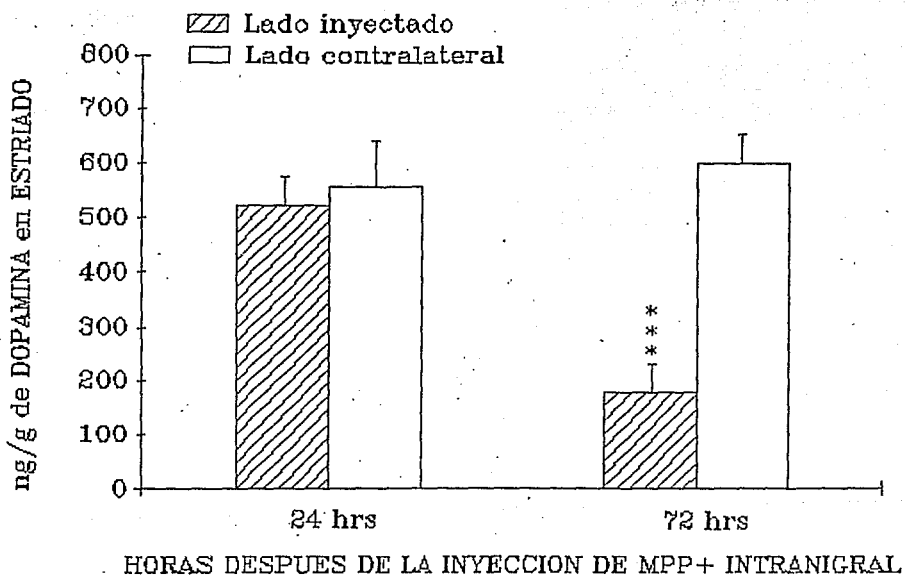


Figura 13. Niveles de DA en estriado a 24 y 72 horas después de la administración intranigral de 10 µg/0.25 µl de MPP+ los valores están expresados en ng/g. Las barras representan M ± EE. Las barras blancas representan el estriado control y las barras rayadas representan el estriado ipsilateral a la SN inyectada con MPP+ (n = 7-12) (***) p < 0.0005).

G) Alteraciones de la actividad enzimática de la GAD por el MPP+ *in vitro*.

Los experimentos *in vitro* demostraron que la actividad de la GAD en la SN no se modificó al agregar 4 mM de MPP+, en presencia o ausencia de PLP (Fig. 14 a y b). Al añadir una cantidad mayor del compuesto (10 mM) se observó un ligero decremento (27%) de la actividad de la enzima en ausencia de PLP pero no en presencia del cofactor ($p < 0.05$). Al utilizar dosis mayores de MPP+ (16.5, 33.3 y 55.8 mM), el efecto sobre la actividad de la GAD fue dosis dependiente, de tal manera que con 16.5 mM de MPP+ el decremento fue del 60.4% con PLP ($p < 0.0005$) y del 49.6% sin PLP ($p < 0.0005$), con 33.3 mM de MPP+, se observó un decremento que se hizo más evidente ya que fue de aproximadamente 60% con y sin PLP ($p < 0.0005$) y, por último, con la dosis de 55.8 mM de MPP+ la disminución de la actividad de la enzima fue alrededor del 70% con y sin PLP ($p < 0.0005$) (Fig. 14 a y b).

Por otra parte, se observó que la actividad de la GAD en homogenados de estriado también decrementó al agregar 33.3 mM de MPP+, esta disminución fue de aproximadamente del 42.3% en presencia de PLP y del 52.6% sin PLP ($p < 0.0005$) (Fig. 15).

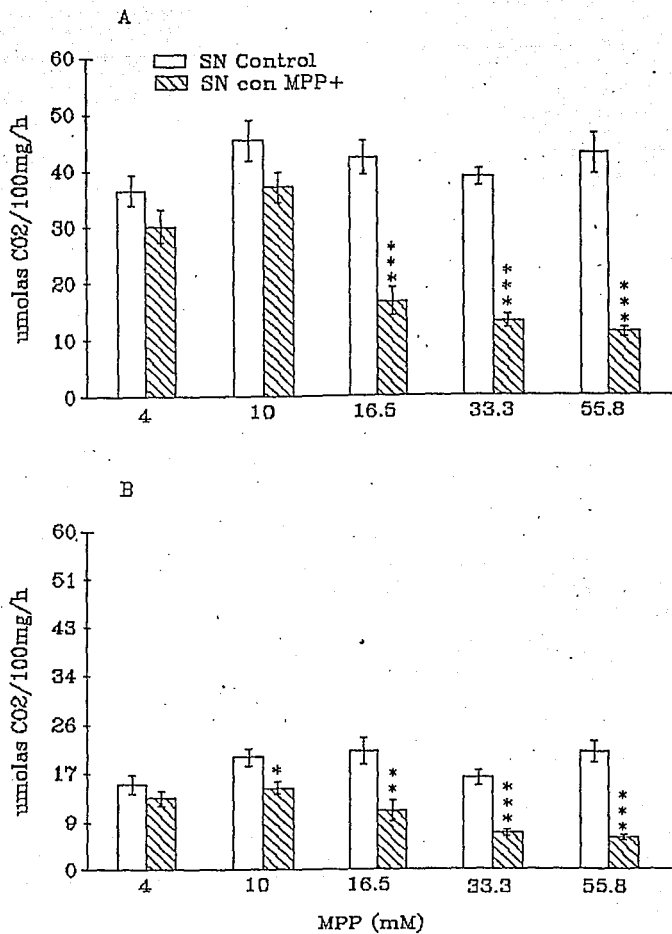


Figura 14. Modificación *in vitro* de la actividad de la GAD en SN por el MPP+ (4, 10, 16.5, 33.3 y 55.8 mM). A) Con PLP y B) Sin PLP. Las barras representan M ± EE. Las barras blancas son las SN control y las barras rayadas son las SN tratadas (n=7-17) (* p < 0.05; ** p < 0.005 y *** p < 0.0005).

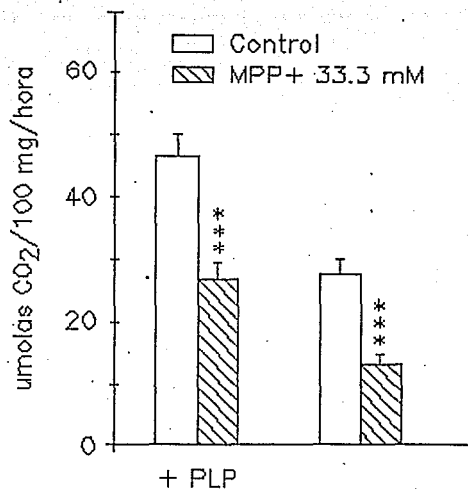


Figura 15. Alteración de la actividad de la GAD en estriado producida por el MPP+ 33.3 mM *in vitro*. Con PLP y sin PLP. Las barras representan M ± EE. Las barras blancas son los estriados control y las barras rayadas son los estriados tratados (n = 9-11) (***) p < 0.0005).

H) Efecto *in vitro* del MPP+ sobre la cinética enzimática de la GAD.

La cinética de la actividad de la GAD se determinó en homogenados de SN en presencia de PLP, en experimentos en que se usaron concentraciones diferentes de MPP+ (10 y 33.3 mM). Como se puede observar en la Figuras 16 y 17, las dos concentraciones de MPP+ produjeron una inhibición de tipo no competitiva sobre la actividad de la GAD. Cuando se añadió 10 mM de MPP+ la Km no se modificó respecto al control sin el compuesto y su valor fue de 23.6 mM, y por otra parte la Vmax se modificó del valor inicial de 156.3 umolas CO₂/100 mg/h en el control a 60.3 umolas CO₂/100 mg/h en presencia del MPP+ (Figs. 16a y 17a). Al añadir 33.3 mM de MPP+, la Km tampoco se modificó significativamente ya que el valor encontrado en el experimento control fue de 16.7 mM y de 16.1 mM con MPP+, sin embargo la Vmax cambió de 138.9 umolas CO₂/100 mg/h en el control a 21.9 umolas CO₂/100 mg/h con MPP+ (Figura 16b y 17b).

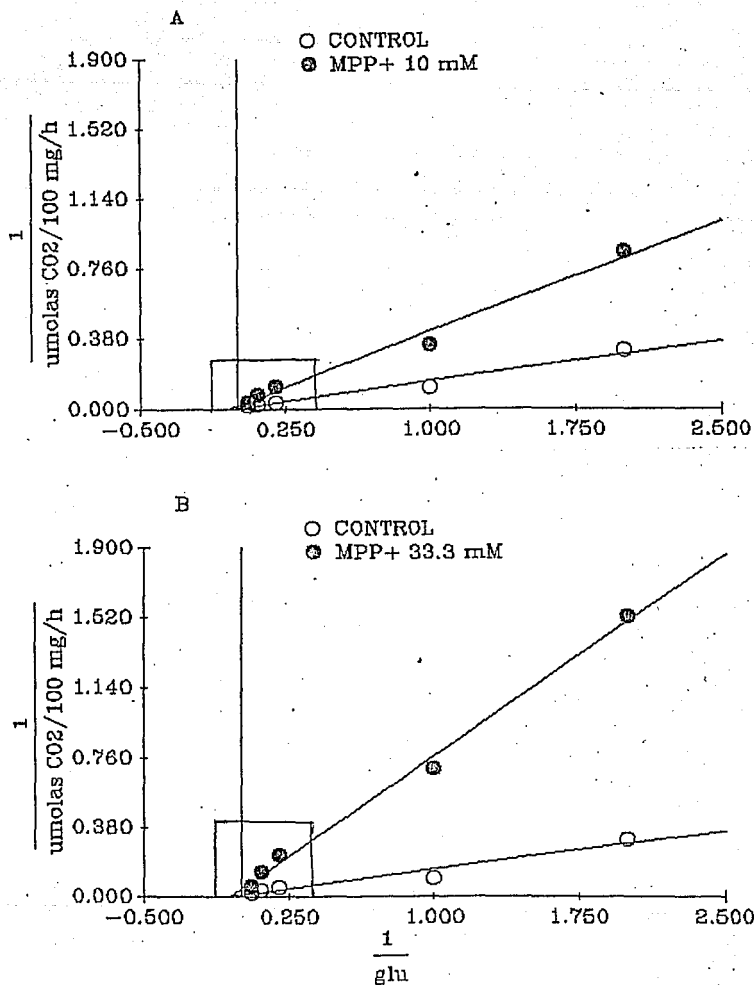


Figura 16. Cinética enzimática de la GAD en SN utilizando varias concentraciones de glutámico (0.5, 1, 5, 10 y 20 mM). A) Con 10 mM de MPP+ y B) Con 33.3 mM de MPP+. En todos los casos se añadió PLP. Los símbolos blancos representan las SN controles y los símbolos oscuros representan las SN tratadas con MPP+ (n = 6-10). En la figura 16 se muestra una ampliación del recuadro.

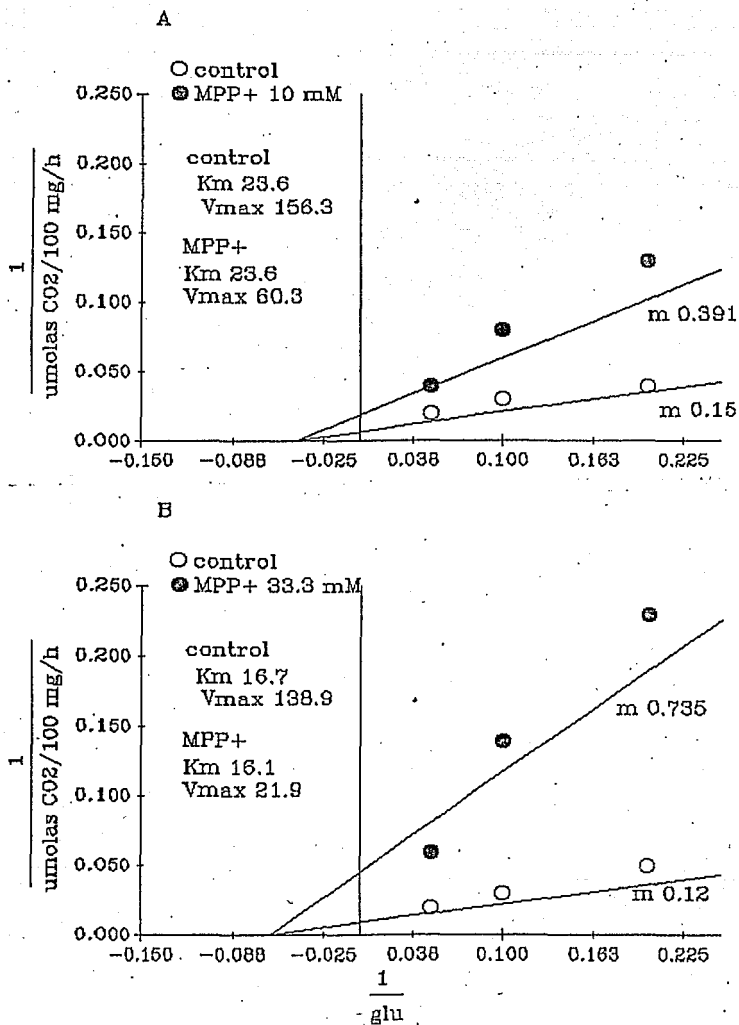


Figura 17. Cinética enzimática de la GAD en SN con varias concentraciones de glutámico 5, 10 y 20 mM. A) Con 10 mM de MPP+ y B) Con 33.3 mM de MPP+. En todos los casos se añadió PLP. Los símbolos blancos representan las SN controles y los símbolos oscuros representan las SN tratadas con MPP+ (n = 6-10). Amplificación del recuadro que se muestra en la Figura 16.

I) Efecto *in vitro* del MPP+ sobre la actividad enzimática de la CAT.

La actividad de la CAT en homogenados de estriado no se modificó al agregar 33.3 mM de MPP+, ya que se observó un valor de 62.1 ± 5.7 nmolas/mg proteína/h ($n = 10$) en el control y de 73.0 ± 7.9 nmolas/mg proteína/h ($n = 10$) en presencia de MPP+ (Fig. 18 a y b). En la sustancia nigra no se determinó el efecto del MPP+ ya que la actividad control de la CAT fue muy baja.

J) Efecto *in vitro* del MPP+ sobre la actividad enzimática de la LDH.

Para realizar estos experimentos la actividad de la deshidrogenasa láctica se evaluó en homogenados de estriado y SN en los que se añadió el MPP+. En estas evaluaciones se concluyó que en ninguna región el MPP+ (33.3 mM) altera la actividad de esta enzima (Fig. 19).

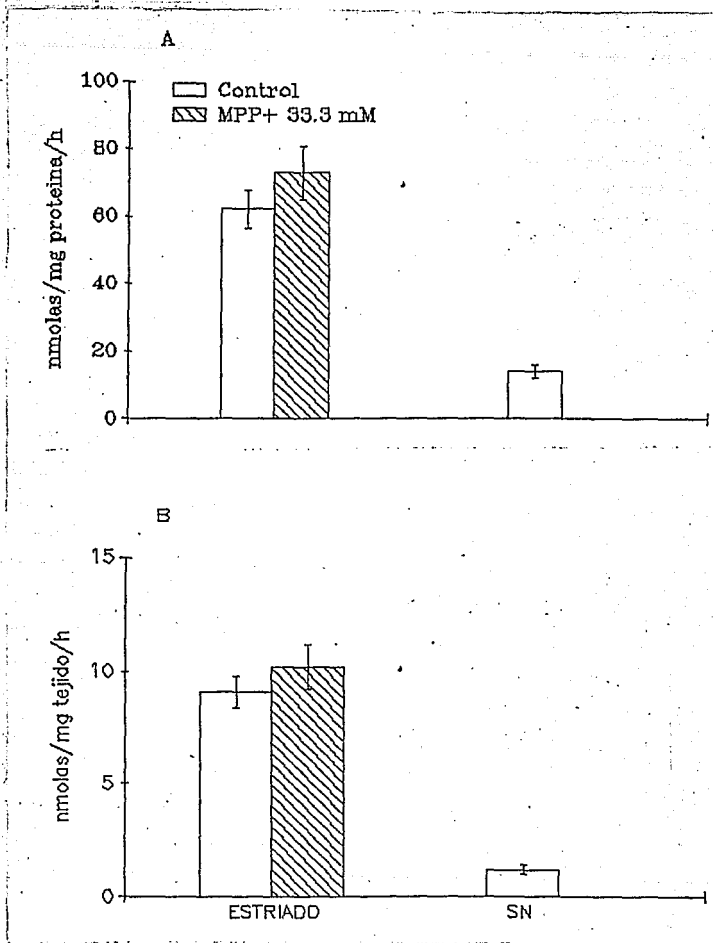


Figura 18. Actividad enzimática de la CAT de estriado agregando 33.3 mM de MPP+ *in vitro* y en SN sin ningún tratamiento. a) Valores expresados en nmol/mg proteína/h y b) Valores expresados en nmol/mg tejido/h. Las barras representan $M \pm EE$. Las barras blancas representan los controles y las barras rayadas representan la administración de 33.3 mM de MPP+ ($n = 4-10$).

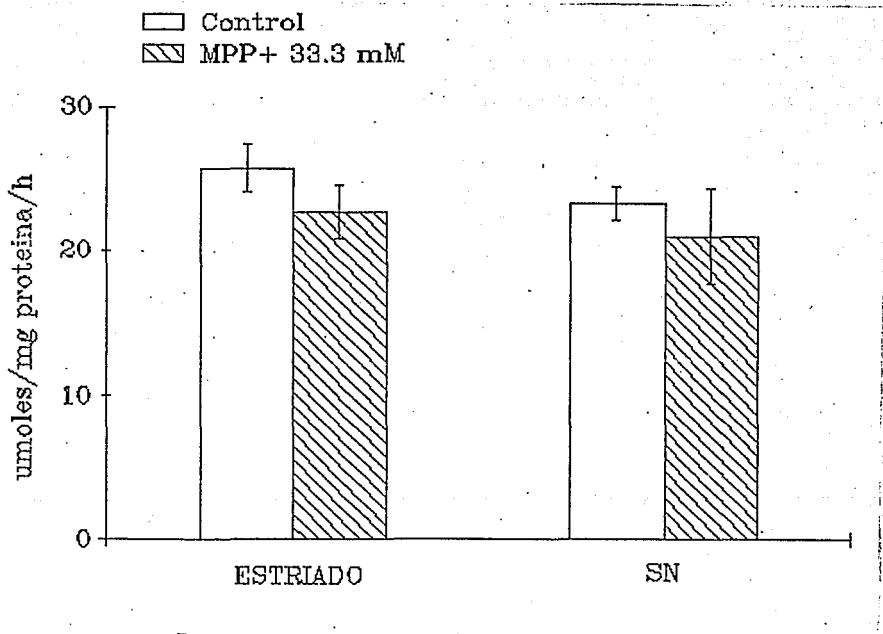


Figura 19. Actividad de la LDH de estradiol y SN agregando 33.3 mM de MPP+ *in vitro*. Los valores se representan en $\mu\text{moles/mg proteína/h}$. Las barras representan $M \pm EE$. Las barras blancas representan los controles y las barras rayadas representan la administración de 33.3 mM de MPP+ ($n = 11-12$).

VI - DISCUSION

A) Alteraciones conductuales inducidas por la administración intranigral de MPP+.

Cuando se administró el MPP+ directamente en la SNr se indujo la aparición de una conducta conocida como conducta de giro que fue contralateral al lado de la inyección, esto es, que el animal giró hacia el lado opuesto a la inyección. Se sabe que la estimulación eléctrica, la manipulación farmacológica o la destrucción de varias estructuras de manera unilateral dentro los ganglios basales producen conducta de giro y, a este respecto, el caso de la SN está bien documentado (Pycock, 1980).

La conducta observada de giro contralateral inducida por el MPP+ intranigral concuerda con reportes previos en que se ha señalado este efecto (Leavitt et al., 1986; Lange, 1989; Sun et al., 1988). Esta misma conducta también se ha visto cuando se administra MPTP en la SNr, aunque se producen menor número de giros que los observados cuando se administra MPP+ (Sirinathsinghji, 1985).

Las neuronas dopaminérgicas de la SNC tienen dendritas que se encuentran en la SNr y que son capaces de liberar y capturar DA (Geffen et al., 1976; Korf et al., 1976; Chéramy et al., 1981; Silbergeld y Walters 1979; Nissbrandt et al., 1989). Se sabe que el MPP+ penetra a estas neuronas por medio del sistema de recaptura de DA (Mayer et al., 1986) por lo que el MPP+, inyectado directamente

en la SNr, puede penetrar en las dendritas e inducir la liberación de DA (Santiago et al., 1991a). En este sentido, la administración de un inhibidor de la recaptura de DA, como la nomifensina, no permite la entrada del MPP+ a las dendritas de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Fig. 20) y, de esta manera, impide la expresión de la conducta de giro inducida por el MPP+ como se pudo observar en los resultados obtenidos (Fig. 8).

La DA que se libera en la SN en respuesta a la administración de MPP+ podría actuar sobre los receptores D1 que se localizan en las terminales GABAérgicas estriatonigrales y de esta manera inducir la liberación de GABA de esta vía (Harrison et al., 1990; Robertson y Robertson, 1987; Robertson, 1992; Ruebi et al., 1977). Se sabe que los receptores dopaminérgicos D1 de las terminales estriatonigrales, que se localizan en la SNr, tienen una participación importante en la conducta de giro contralateral inducida por la DA nigral ya que, cuando se bloquean estos receptores en la SNr, no se produce dicha conducta (Robertson y Robertson, 1989). El GABA que se libera por la estimulación de los receptores D1 de las terminales de la vía estriatonigral actúa sobre los receptores GABA_A que se localizan en las neuronas GABAérgicas de proyección al tálamo (Fig. 20) (Deniau y Chevalier, 1985; Chevalier y Deniau, 1987). Este mecanismo puede dar lugar a la expresión de la conducta de giro contralateral, ya que cuando se administran agonistas GABAérgicos como el muscimol en la SNr, se produce dicha conducta (Scheel-Krüger et al., 1977; Martin et al., 1978; Reavill et al., 1979; Tapia y Flores-Hernández, 1990). Así,

la conducta de giro contralateral inducida por la administración aguda de MPP+ en la SNr podría explicarse a través de este mecanismo (Fig. 20). De hecho, cuando se administra MPTP en la SN se produce una conducta de giro contralateral, que se puede bloquear por la administración intranigral previa de picrotoxina, antagonista GABAérgico (Sirinathsinghji, 1985).

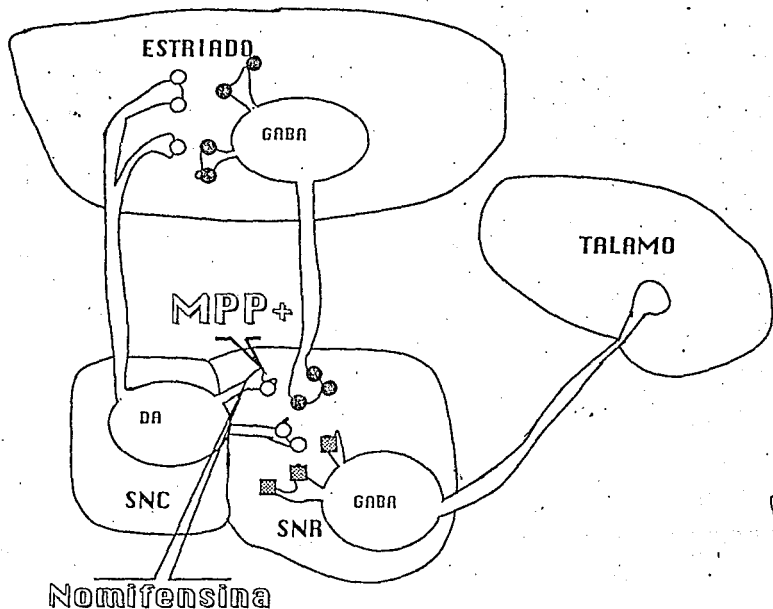


Figura 19) Mecanismo de acción del MPP+ sobre las dendritas de las neuronas dopaminérgicas para inducir la conducta de giro contralateral a tiempos cortos (ver texto). Se muestra el sitio de acción de la nomifensina en la SN. Círculos blancos - receptores D1, círculos negros - receptores D2 y cuadrados - receptores GABAérgicos.

La conducta de giro contralateral producida por el MPP+ expresada a largo tiempo podría deberse principalmente a una acción directa de esta toxina sobre las neuronas GABAérgicas de la SNr, ya que el MPP+ produce un daño muy notable de las mismas, que se refleja histológicamente y por la disminución de la actividad de la GAD. La conducta de giro contralateral inducida por la administración intranigral de MPP+ persiste por más de 24 horas; esto se concluye de un trabajo previo en que observamos que al administrar 10 µg/ 0.25 µl de MPP+ por vía intranigral, la conducta persiste hasta 5 días después de su infusión (Tapia y Jasso, 1991), lo cual correlaciona con el daño que provoca el MPP+ a las neuronas GABAérgicas. Estos resultados son similares a los observados cuando se administran otras neurotoxinas en la SNr, como el Rojo de rutenio, ya que también se produce conducta de giro contralateral persistente hasta tres días después de la inyección (Tapia y Flores-Hernández, 1990) y la misma conducta se observa cuando se administran intranigralmente agonistas GABAérgicos, como el muscimol: En este caso la conducta persiste solo pocas horas después su administración, ya que no se produce daño de la SNr (Martin et al., 1978; Tapia y Flores-Hernández, 1990). Tal como lo muestran nuestros resultados histológicos, el MPP+ produce lesión en la SNr, además de que disminuyen la actividad de la GAD y los niveles de GABA en esta región, todo lo cual apoya la idea de que el MPP+ está dañando directamente a las neuronas GABAérgicas de la SNr.

No es muy probable que la conducta de giro contralateral

inducida por MPP+ se provoque como resultado de una inhibición de la actividad de la GAD, ya que se ha demostrado que cuando se administra en la SNr la alilglicina, que es un inhibidor de la GAD, se produce una conducta de giro contralateral que no dura mucho tiempo (Beart y Bilal, 1979) y otros autores también han demostrado que la administración intranigral de otros inhibidores de la GAD, como la Tiosemicarbazida, el L-glutamil τ -hidrazida y la τ -glutamil hidrazona de PLP, no producen ninguna conducta aparente (Tapia y Salazar, 1991).

Resultados previos obtenidos por nosotros indican que la participación del sistema dopaminérgico nigroestriatal en la expresión a largo plazo de la conducta de giro contralateral producida por el MPP+ no parece ser importante ya que, cuando se administra haloperidol, antagonista dopaminérgico no selectivo, previamente a la administración del MPP+ intranigral no se produce ningún cambio en la conducta (Tapia y Jasso, 1991).

B) Neurotoxicidad del MPP+ sobre las neuronas GABAérgicas.

El estudio histológico demuestra que el MPP+ ejerce un claro efecto neurotóxico sobre las neuronas GABAérgicas, que se refleja por la presencia de células picnóticas. Paralelamente, la administración de MPP+ sobre las neuronas GABAérgicas de la SNr produjo una disminución dosis dependiente de la actividad de la GAD que llegó a ser hasta del 90% con la dosis más alta administrada

(10 µg/ 0.25 µl) (Fig. 11). Este resultado se correlaciona con la disminución de los niveles de GABA en la SN inyectada con MPP+.

Existen diversas evidencias de que el MPP+ no ejerce un daño selectivo sobre las neuronas dopaminérgicas, sino que tiene un efecto neurotóxico inespecífico sobre otras células que contienen otros neurotransmisores como serotonina, norepinefrina, glutamato y GABA (Namura et al., 1987; Takada et al., 1987; Altar et al., 1986; Heikkila et al., 1985, Kuriyama et al., 1990; Marini et al., 1989).

Respecto al efecto sobre las neuronas GABAérgicas, se había encontrado que la administración intracerebral de MPTP en la rata disminuye los niveles del transmisor en la SN y estriado (Altar et al., 1986; Heikkila et al., 1985), y un efecto similar se observa si el compuesto se aplica intraperitonealmente en el ratón (Kuriyama et al., 1990). El decremento de la concentración de GABA en la SN de la rata cuando se administraron 25 µg de MPP+ en el haz del cerebro medio anterior fue del 60% (Altar et al., 1986) y fue del 10% en el estriado al administrar 10 y 25 µg de MPP+ directamente en el estriado (Heikkila et al., 1985), lo cual indica que podría haber un mayor efecto neurotóxico del MPP+ sobre las neuronas GABAérgicas de la SN. A diferencia de esos estudios, donde se sacrificaron a las ratas en un período de diez a treinta días posteriores a la administración del MPP+, en este trabajo el animal se sacrificó 24 horas después de la administración intranigral de 6 µg de MPP+ y el decremento en los niveles de GABA que se encontró en la SN fue del 33% (Fig. 12).

El daño que produce el MPP+ sobre las neuronas GABAérgicas podría deberse a que el MPP+ penetra a ellas. Esta hipótesis se apoya en trabajos previos que demuestran que el MPP+ es capaz de penetrar por difusión a terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas) (Scotcher et al., 1991), y una vez dentro de las neuronas GABAérgicas el MPP+ podría causar la muerte al interferir con la cadena respiratoria (Mizuno et al., 1987a). De esta manera, el decremento en la actividad de la GAD que se observó en la SN cuando se administró el MPP+ podría deberse a un efecto neurotóxico directo sobre dichas células lo que daría lugar a la muerte neuronal observada histológicamente.

El daño a las neuronas GABAérgicas inducido por el MPP+ podría dar lugar a la disminución de la actividad de la GAD como consecuencia de un decremento generalizado del metabolismo energético de la célula (muerte celular), o porque el MPP+ esté produciendo una disminución de la cantidad de enzima que se produce en condiciones normales en la SNr; cualquiera de estos dos mecanismos podría conducir a la disminución de la síntesis de GABA observada al analizar los niveles de este neurotransmisor en la SN (Fig. 12). Es importante resaltar que en estados avanzados de la enfermedad de Parkinson también se ha visto una disminución importante de la actividad de la GAD en la SN, y esto de alguna manera podría participar en los déficits motores que se presentan en esta enfermedad (Lloyd y Hornykiewicz, 1973; Lloyd et al., 1975).

Por otra parte, después de 72 horas de la administración del

MPP+ intranigral encontramos un decremento importante de los niveles de DA en el estriado (Fig. 13), lo cual confirma la idea de que cuando se inyecta el MPP+ en la SN a lo largo del tiempo daña de manera importante a las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal (Bradbury et al., 1986; Leavitt et al., 1986). En acuerdo con esto, se ha observado que se produce una disminución de la actividad de la TH y de los niveles de DA en el estriado cuando se administra sistémicamente MPTP a ratones o a ratas, y ello es un índice del daño neuronal en la región (Hirata y Nagatsu, 1986; Matsuda et al., 1986).

C) Inhibición de la actividad de la GAD agregando el MPP+ *in vitro*.

Nuestros resultados muestran que al agregar el MPP+ a los homogenados de tejido, tanto de estriado como de SN, se inhibió la actividad de la GAD. Esta inhibición se dió en presencia y en ausencia de PLP, y fue de tipo no competitiva (Fig. 17), lo cual indica que el MPP+ se une a la GAD en un sitio distinto del sustrato (glutámico) para inhibirla. Se adicionó MPP+ (33.3 mM) (concentración que inhibió la actividad de la GAD), para medir las actividades de la CAT y de la LDH, y en ninguno de los dos casos se observó inhibición enzimática, lo cual apoya el hecho de que esa concentración utilizada del MPP+ no es totalmente inespecífica ya que no inhibe a otras enzimas. A este respecto se tienen evidencias de que el MPTP y el MPP+ *in vitro* inhiben la actividad de varias

enzimas como la NAD-Q reductasa, enzima que participa en el Complejo I de la cadena respiratoria (Fig. 6) (Pai y Ravindranath, 1991), inhibición que es dosis dependiente (Cleeter et al., 1992). El MPP+ *in vitro* también inhibe competitivamente la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Mizuno et al, 1987b), así como la MAO tipo A y B; la inhibición de ambas enzimas se da de manera competitiva y el MPP+ es un inhibidor más potente para la MAO A (Kinemuchi et al., 1985; Arai et al., 1986). Sin embargo, no en todos los casos se ha visto inhibición de la actividad enzimática por el MPTP y el MPP+. Por ejemplo, ambos compuestos son incapaces de inhibir la actividad de otras enzimas del complejo respiratorio como la succinato-Q reductasa, citocromo reductasa, citocromo c y citocromo oxidasa (Mizuno et al., 1987a) y tampoco inhiben la actividad de la TH (Hirata y Nagatsu, 1985).

Aunque las concentraciones de MPP+ *in vitro* que se utilizaron en este trabajo para inhibir la actividad de la GAD pudieran parecer demasiado altas, es claro que no se trata de un efecto inespecífico o desnaturalizante de proteínas, ya que no se afectaron las otras enzimas solubles estudiadas. Es difícil saber si esta inhibición directa ocurre *in vivo*. Tal vez la exposición repetida de los animales a dosis menores de MPP+, o el evaluar los efectos neurotóxicos a tiempos más largos, permitiría conocer si se producen cambios importantes en la actividad enzimática de la GAD que no se deban a muerte neuronal.

La inhibición que produce el MPP+ sobre la actividad de la GAD, aunada a la que producen el MPTP y el MPP+ sobre enzimas como

la NADH-Q, la α -cetoglutarato deshidrogenasa, y la MAO A y B, sugiere que tal vez estas toxinas podrían alterar *in vivo* varios sistemas metabólicos y de neurotransmisores (Pai y Ravindranath, 1991; Mizuno et al., 1987b; Kinemuchi et al., 1985).

K) REFERENCIAS

- Albin R., Young A. B. y Penney J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. TINS. 12, 366-75.
- Alexander G. M., Schwartzman R. J., Brainard L., Gordon S. W. y Grothusen J. R. (1992). Changes in brain catecholamines and dopamine uptake sites at different stages of MPTP parkinsonism in monkeys. Brain Res. 588, 261-269.
- Altar C. A., Heikkila R. E., Manzano L. y Marien M. R. (1986). 1-Methyl-4-phenylpyridine (MPP+): regional dopamine neuron uptake, toxicity, and novel rotational behavior following dopamine receptor proliferation. Eur J Pharmacol. 131, 199-209.
- Andersen P. H., Gringrich J. A., Bates M. D., Dearth A., Falardeau P., Senogles S. E. y Caron M. G. (1990). Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. TIPS. 11, 231-235.
- Arai Y., Kinemuchi H., Hamamichi N., Satoh N., Tadano T. y Kisara K. (1986). Inhibition of rat brain monoamine oxidase by some analogues of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. Neurosc Lett. 66, 43-48.
- Ballarin M., Reiriz J., Ambrosio S., Camps M., Blesa R. y Mahy N. (1989). Acute effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) on purine metabolism in rat striatum studied in vivo using the microdialysis technique. Brain Res. 483, 184-187.

- Beal M. F., Hyman B. T. y Koroshetz W. (1993). Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases?. TINS. 16, 125-131.
- Beart P. M. y Bilal K. (1979). Allylglycine: Intranigral effects and reappraisal of actions on the GABA system. Biochem Pharmacol. 28, 449-454.
- Benecke (1989). The pathophysiology of Parkinson's disease. En: Disorders of movement. (Quinn N. y Jenner P. eds.). Academic Press, 567 pp.
- Beresford I. J. M., Davenport A. P., Sirinathsinghji D. J. S., Hall M. D., Hill R. G. y Hughes J. (1988). Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP+ into the nigrostriatal dopamine pathway-II. Differential localization of dopamine and cholecystokinin receptors. Neuroscience. 27, 129-143.
- Bolam P. y Smith Y. (1991). Characterization of the synaptic inputs to dopaminergic neurones in the rat substantia nigra. En: The Basal ganglia III. Advances in behavioral biology. Vol. 39. (Bernardi G., Carpenter M.B., Di Chiara G., Morelli M. y Stanzione P. eds.). Plenum Press. 119-131.
- Bormann J. (1988). Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. TINS. 11, 112-116.
- Boyce S., Kelly E., Reavill C., Jenner P. y Marsden D. (1984). Repeated administration de N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurones. Biochem Pharmacol. 33, 1747-1752.

- Bradbury A. J., Costall B., Domeneq A. M., Jenner p., Kelly M. E., Marsden C. D. y Naylor R. J. (1986). 1-methyl-4-phenylpyridine is neurotoxic to the nigrostriatal dopamine pathway. Nature. 319, 56-57.
- Burns R. S., Chuang C. C., Sanford P. M., Ebert M. H., Jacobowitz D M. y Kopin I. J. (1983). 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 Nat Acad Sci USA. 80, 4546-4550.
- 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. (1985). Positron emission tomography after MPTP: observations relating to the cause of Parkinson's disease. Nature. 317, 246-248.
- Camacho-Arroyo I. y Tapia R. (1992). Levels, uptake, and release of glycine and glutamate in the rat pontine reticular formation. Neurochem Res. 17, 463-467.
- Carpenter M. B. (1981). Anatomy of the corpus striatum and brain stem integrating systems. En: Handbook of physiology. The Nervous system, Vol. II. (Brookhart J.M., Mouncastle V. B., Brooks V. B. y Geiger S. P. eds.) American Physiological Society. 735-1480.
- Castagnoli N., Chiba K. y Trevor A. J. (1985). Potential bioactivation pathways for the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Life Sci. 36, 225-230.

- Cheramy A., Leviel V. y Glowinsky J. (1981). Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. Nature. 289, 537.
- Chevalier G., Vacher S., Deniau G. M. and Desban M. (1985). Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. I. The striato-nigral influence on tecto-spinal/tecto-diencephalic neurons. Brain Res. 334, 215-226.
- Chevalier G. y Deniau J. M. (1987). Functional significance of a double GABAergic inhibitory link in the striato-nigro-fugal pathways. En: Neurotransmitter interactions in the basal ganglia. (Sandler M., Feuerstein C. y Scatton B. eds.). Raven Press, New York. 83-94.
- Chiueh C. C., Markey S. P., Burns R. S., Johannessen J. N., Pert A. y Kopin I. J. (1984). 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. 100, 189-194.
- Cleeter M. W. J., Cooper J. M. y Schapira A. H. V. (1992). Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: Evidence for free radical involvement. J Neurochem. 58, 786-789.
- Davis G. C., Williams A. C., Markey S. P., Ebert M. H., Caine E. D., Reichert C. M. y Kopin I. J. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. Psych Res. 1, 249-254.

- D'Amato R. J., Lipman Z. P. y Snyder S. H. (1986). Selectivity of the Parkinsonian neurotoxin MPTP: Toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin. Science. 231, 987-989.
- Delong M. R., Alexander G. E., Miller W.C. y Crutcher M. D. (1990). Anatomical and functional aspects of basal ganglia thalamocortical circuits. En: Function and disfunction in the basal ganglia. (Franks A. J., Ironside J. W., Mindham R. H. S., Smith R. J., Spokes E. G. S. y Winlow E. eds.). Manchester University Press. 3-32.
- Deniau J. M., Chevalier G., (1985). Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. II. The striato-nigral influence on thalamocortical cells of the ventromedial thalamic nucleus. Brain Res. 334, 227-233.
- Deniau J. M. and Chevalier G. 1992. The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: distribution of projection neurons. Neuroscience. 46, 361-377.
- Di Monte D., Jewell S. A., Ekstrom G., Sandy M. S. y Smith M. T. (1986). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyrrole (MPP+) cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun. 137, 310-315.
- Di Monte D. A., Wu E. Y., Irwin I., Delaney L. E. y Langston W. J. (1992). Production and disposition of 1-methyl-4-phenylpyridinium in primary cultures of mouse astrocytes. Glia. 5, 48-55.

- Doudet D. J., Gross C., Arluison M. y Bioulac B. (1990). Modifications of precentral cortex discharge and EMG activity in monkeys with MPTP-induced lesion of DA nigral neurons. Exp Brain Res. 80, 177-188.
- Dubois B., Pillon B., Sternic N., Lhermitte F. and Agid Y. (1990). Age-induced cognitive disturbances in Parkinson's disease. Neurology. 40, 38-41.
- Duran R., Aldegunde M. y Marco J. (1985). Simple HPLC-EC method for the simultaneous determination of biogenic amines and their main metabolites in small rat brain regions. Anal Lett. 18, 2173-2181.
- Efange S: M. N., Kung H. F., Mash D. C., Jabir M., Billings J., Pablo J., Dutta A. y Freshler A. (1990). Pargyline-sensitive selective accumulation of radiolabeled MPTP analog in the primate cerebral cortex and basal ganglia Synapse. 5, 207-212.
- Enz A., Hefti F. y Frick W. (1984). Acute administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) reduces dopamine and serotonin but accelerates norepinephrine metabolism in the rat brain. Effect of chronic pretreatment with MPTP. Eur J Pharmacol. 101, 37-44.
- Erlander M. G., Tillakaratne N. J. K., Feldblum S., Patel N. y Tobin A. J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. Neuron. 7, 91-100.
- Fahn S. (1990). Akinesia. En: Motor Disturbances II. (Berardelli A., Benecke R., Manfredi M. y Marsden C. D. eds.). Academic

Press. 140-150.

Fallon J. H. y Loughlin S. E. (1985). Substantia nigra. En: The rat nervous system. Vol 1. Forebrain and midbrain. (Paxinos G. eds.). Academic Press, 353-374.

Fonnum F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. J Neurochem. 24, 407-409.

Forno L. S., Langston J. W., DeLanney L. E., Irwin I. y Ricaurte G. a. (1986). Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. Ann Neurol. 20, 449-455.

Friedman L. K. y Mytilineou C. (1990). Neurochemical and toxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridine to rat serotonin neurons in dissociated cell cultures. J Pharm Exp Ther. 253, 892-898.

Geffen L. B., Jessel T. M., Cuello A. C. y Iversen L. L. (1976). Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. Nature. 260, 258-260.

Gerfen C. R. (1984). The neostriatal mosaic: Compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. Nature. 311, 461-464.

Gerfen C. R. (1987a). The neostriatal mosaic: The reiterated processing unit. En: Neurotransmitter interactions in the basal ganglia. (Sandler M., Feuerstein C. y Scatton B. eds.). Raven Press, 19-29.

- Gerfen C. R. (1987b). The neostriatal mosaic: II. patch-and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. J Neurosci. 7, 3915-3934.
- Gerfen C. R. (1989). The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. Science. 246, 385-388.
- Gerfen C. R. (1992). The neostriatal mosaic: Multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. Annu Rev Neurosci. 15, 285-320.
- Gibb W. R. G., Costall B., Domeneq A. M., Kelly M. E. y Naylor R. J. (1988). The histological effects of intracerebral injection or infusion of MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium) in rat and mouse. Brain Res. 461, 361-366.
- Gibb W. R. G. (1989). The pathology of Parkinsonian disorders. En: Disorders of movement. (Quinn N. y Jenner P. eds.). Academic Press, 567 pp.
- Graybiel A. M. (1984). Neurochemically specified subsystems in the basal ganglia. En: Functions of the basal ganglia. (Ciba foundation symposium eds.). Pitman Publishing Ltd, 114-144.
- Graybiel A. M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. TINS. 13, 244-254.
- Hadjiconstantinou M., Tjioe S., Alho H., Miller C. y Neff H. (1987). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) accelerates the accumulations of lipofuscin in mouse adrenal

- gland. Neurosci Lett. 83, 1-6.
- Hantraye P., Varastet M., Peschanski M., Riche D., Cesaro P., Willer J. C. y Maziere M. (1993). Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. Neuroscience. 53, 169-178.
- Harik S. I., Schmidley J. W., Iacofano L. A., Blue P., Arora P. K. y Sayre L. M. (1987). On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: The effect of perinigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, its metabolite and their analogs in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 241, 669-676.
- Harrison M. B., Swiley R. G. y Wooten G. F. (1990). Selective localization of striatal D1 receptors to striatonigral neurons. Brain Res. 528, 317-322.
- Hasegawa E., Takeshige K., Oishi T., Murai Y. y Minakami S. (1990). 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Biochem Biophys Res Commun. 170, 1049-1055.
- Heikkila R. E., Nicklas W. J. y Duvoisin R. C. (1985). Dopaminergic toxicity after stereotaxic administration of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) to rats. Neurosci Lett. 59, 135-140.
- Hemrick-Luecke S. K., Robertson D. W., Krushinski J. H. y Fuller R. W. (1992). Persistent depletion of striatal dopamine

- and cortical norepinephrine in mice by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-3-pyridinol (MPTP-3-ol), an analog of MPTP. Life Sci. 50, 573-582.
- Herkenham M., Little M. D., Bankiewicz K., Yang S. C. Markey S. P. y Johannessen J. N. (1991). Selective retention of MPP+ within the monoaminergic systems of the primate brain following MPTP administration: an *in vivo* autoradiographic study. Neuroscience. 40, 133-158.
- Hirata Y. y Nagatsu T. (1985). Inhibition of tyrosine hydroxylation in rat striatal tissue slices by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. Neurosci Lett. 57, 301-305.
- Hirata Y. y Nagatsu T. (1986). Early and late effects of systemically administered 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on tyrosine hydroxylase activity *in vitro* and on tyrosine hydroxylation in tissue slices of mouse striatum. Neurosci Lett. 68, 245-248.
- Hirsch E., Graybiel A. M. y Agid Y. A. (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. Nature. 334, 345-348.
- Hoskins J. A. y Davis L. J. (1989). The acute effect on levels on catecholamines and metabolites in brain, of a single dose of MPTP in 8 strains of mice. Neuropharmacology. 28, 1389-1397.
- Hu S. C., Chang F. W., Sung Y. J., Hsu W. M. y Lee E. H. (1991). Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the substantia nigra and the locus coeruleus in BALB/c mice. J Pharmacol Exp Ther. 259, 1379-

1387.

Iacopino A., Christakos S., German D., Sonsalla P. K. y Altar C. A. (1992). Calbindin-D_{28K}-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity. Mol Brain Res. 13, 251-261.

Ikebe S., Tanaka M., Ohno K., Sato W., Hattori K., Kondo T., Mizuno Y. y Ozawa T. (1990). Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. Biochem Bioph Res Comm. 170, 1044-1048.

Irwin I. y Langston W. J. (1985). Selective accumulation of MPP+ in the substantia nigra: A key to neurotoxicity?. Life Sci. 36, 207-212.

Jankovic J. (1987). Pathophysiology and Clinical Assessment of motor symptoms in Parkinson's disease. En: Handbook of Parkinson's disease. (Koller W. C. eds.). Marcell Dekker. 99-126.

Javitch J. A., Uhl G. R. y Snyder S. H. (1984). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Characterization and localization of receptor binding sites in rat and human brain. Proc Natl Acad Sci USA. 81, 4591-4595.

Javoy-Agid F. y Agid Y. (1980). Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease?. Neurology. 30, 1326-1330.

Javoy-Agid F., Ploska A. y Agid Y. (1981). Microtopography of tyrosine hydroxylase, glutamic acid decarboxylase, and

choline acetyltransferase in the substantia nigra and ventral tegmental area of control and parkinsonian brains.

J Neurochem. 37, 1218-1227.

Jellinger K. (1990). Changes in subcortical nuclei in Parkinson's disease. En: Function and dysfunction in the basal ganglia.

(Franks A. J., Ironside J. W., Mindham R. H. S., Smith R. J., Spokes E. G. S. y Winlow W. eds.). W. Manchester University Press, 69-95 pp.

Jenner P., Rupniak N. M., Rose S., Kelly E., Kilpatrick G., Lees A. y Marsden D. (1984). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. Neurosci Lett. 50, 85-90.

Jenner P., Taquet H., Mauborgne A., Benoliel J. T., Cesselin F., Rose S., Javoy-Agid F., Agid Y. y Marsden C. D. (1986). Lack of change in basal ganglia neuropeptide content following subacute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment of the common marmoset. J Neurochem. 47, 1548-1551.

Jonsson C., Sundström E., Nwanze E., Hallman H. y Luthman J. (1986). Mode of action of MPTP of catecholamine neurons in the mouse. En: MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. (Markey S. P., Castagnoli N., Trevor A. J. y Kopin I. J. eds.). Academic Press. 253-274.

Kaufman M. J. y Madras B. (1991a). Severe depletion of cocaine recognition sites associated with the dopamine transporter in Parkinson's-diseased striatum. Synapse. 9, 43-49.

- Kaufman D. L., Houser C. R. y Tobin A. J. (1991). Two forms of the τ -Aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. J Neurochem. 56, 720-723.
- Kinemuchi H., Arai Y. y Toyoshima Y. (1985). Participation of brain monoamine oxidase B form in the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Relationship between the enzyme inhibition and the neurotoxicity. Neurosci Lett. 58, 195-200.
- Kitai S. T. (1981). Electrophysiology of the corpus striatum and brain stem integrating systems. En: Handbook of physiology. The Nervous system, Vol. II. (Brookhart J.M., Muncastle V. B., Brooks V. B. y Geiger S. P. eds.) American Physiological Society. 735-1480.
- Kitt C. A., Cork L. C., Eidelberg F., Joh T. H. y Price D. L. (1986). Injury of nigral neurons exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: A tyrosine hydroxylase immunocytochemical study in monkey. Neuroscience. 17, 1089-1103.
- König J. F. R. y Klippel R. A. (1963). The rat brain: A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kopin I. J. (1986). Toxins and Parkinson's disease: MPTP Parkinsonism in human and Animals. En: Advances in Neurology. Parkinson's disease. Vol. 45 (Yahr M. D. y Bergmann K. J. eds.). Raven Press, 137-143.

- Korf J., Zielemann M. y Westerink (1976). Dopamine release in substantia nigra?. Nature. 260, 257-258.
- Kupsch A., Loschmann P., Sauer H., Arnold G., Renner P., Pufal D., Burg M., Wachtel H., Bruggencate G. y Oertel W. H. (1992). Do NMDA receptor atagonist protect against MPTP-toxicity? Biochemical and immunocytochemical analyses in black mice. Brain Res. 592, 74-83.
- Kuriyama T., Taguchi J. y Kuriyama K. (1990). Functional alterations in striatal cholinergic and striato-nigral gabaergic neurons following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration. Neurochem Int. 16, 319-329.
- Lange K. W. (1989). Circling behavior in old rats after unilateral intranigral injection of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Life Sci. 45, 1709-1714.
- Lange K. W. (1990). Behavioural effects and supersensitivity in rat following intranigral MPTP and MPP+ administration. Eur J Pharmacol. 175, 57-61.
- Langston J. W., Tetrud J. W. y Irwin I. (1983a). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. Science. 218, 979-980.
- Langston J. W. and Ballard P. A. (1983b). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. New Engl J Med. 4, 310.
- Langston J. W., Forno L. S., Rebert C. S. y Irwin I. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of

- 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. Brain Res. 292, 390-394.
- Langston J. W. (1985). MPTP and Parkinson's disease. TINS. 8, 79-83.
- Langston J. W., Irwin I., Langston E. B., DeLanney L. E. y Ricaurte G. A. (1986). 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. (Markey S. P., Castagnoli N., Trevor A. J. y Kopin I. J. eds.). Academic Press, 9-21.
- Langston J. W. (1988). Neuromelanin-containing neurons are selectively vulnerable in Parkinsonism. TIPS. 9, 347-348.
- Leavitt M. L. y Gittings M. L. (1986). Locomotor and neurochemical effects of intranigral MPP+ iodide in the rat. En: MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. (Markey S. P., Castagnoli N., Trevor A. J. y Kopin I. J. eds.). Academic Press, 581-589.
- Levi A. C., DeMattei M., Ravazzani R., Corvetti G., Golden G. T. y Fariello R. G. (1989). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on ultrastructure of nigral neuromelanin in Macaca fascicularis. Neurosci Lett. 96, 271-276.
- Levitt P., Pintar J. E. y Breakfield X. O. (1982). Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 79, 6385-6389.

- Llorens-Cortes C., Javoy-Agid F., Agid Y., Taquet H. y Schwatz J. C. (1984). Enkephalinergetic markers in substantia nigra and caudate nucleus from parkinsonian subjects. J Neurochem. 43, 874-877.
- Lloyd K. G. y Hornykiewicz O. (1973). L-glutamic acid decarboxylase in Parkinson's disease: Effect of L-dopa therapy. Nature. 243, 521-523.
- Lloyd K. G., Mohler H., Heitz P. y Bartholini G. (1975). Distribution of choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase within the substantia nigra and in other brain regions from control and parkinsonian patients. J Neurochem. 25, 789-795.
- López-García J. C., Bermúdez-Rattoni F. y Tapia R. (1990). Release of acetylcholine, τ -aminobutirate, dopamine and glutamate, and activity of some related enzymes, in rat gustatory neocortex. Brain Res. 523, 100-104.
- Lowry O. H., Roserbrough N. J., Farr L. y Randall R: J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 193, 265-275.
- Marini A. M., Schwartz J. P. y Kopin I. J. (1989). The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium in cultured cerebellar granule cells. J Neurosc. 9, 3665-3672.
- Marini A. M. y Paul S. M. (1992). N-Methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection in cerebellar granule cells requires new RNA and protein synthesis. Proc Natl Acad Sci USA. 89, 6555-6559.

- Martin G. E., Papp N. L. y Bacino C. B. (1978). Contralateral turning evoked by the intranigral microinjection of muscimol and other GABA agonists. Brain Res. 155, 297-312.
- Martin D. L. y Rimvall K. (1993). Regulation of τ -Aminobutyric acid synthesis in the brain. J Neurochem. 60, 395-407.
- Matsuda L., Schmidt C. J., Hanson G. R. y Gibb J. W. (1986). Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase in rat. Neuropharmacology. 25, 249-255.
- Mauborgne A., Javoy-Agid F., LeGrand J. C., Agid Y. y Cesselin F. (1983). Decrease of substance P-like immunoreactivity in the substantia nigra and pallidum of parkinsonian brains. Brain Res. 268, 167-170.
- Mayers R. A., Kindt M. V. y Heikkila R. E. (1986). Prevention of MPTP-induced neurotoxicity by dopamine uptake inhibitors. En: MPTP: A neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome. (Markey S. P., Castagnoli N., Trevor A. J. y Kopin I. J. eds.). Academic Press, 585-589.
- Mayeux R., Stern Y., Rosen J. y Leventhal S. (1981). Depression, intellectual imparment and Parkinson's disease. Neurology. 31, 645-650.
- Mayeux R. (1987). Mental state. En: Handbook of Parkinson's disease. (Koller W. C. eds.). Marcel Dekker, 505 pp.
- McGeer P.L., McGeer E. G., Wada J. A. y Jung E. (1971). Effects of globus pallidus lesions and Parkinson's disease on brain glutamic acid decarboxylase. Brain Res. 32, 425-431.

- Mitra M., Mohanakumar K. P. y Ganguly D. K. (1992). Dissociation of serotonergic and dopaminergic components in acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. Brain Res Bull. 28, 355-364.
- Mitchell I. J., Cross A. J., Sambrook M. A. y Crossman A. R. (1985). Sites of the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the macaque monkey include the ventral tegmental area and the locus coeruleus. Neurosci Lett. 61, 195-200.
- Mitchell I. J., Clarke C. E., Boyce S., Robertson R. G., Peggs D., Sambrook M. A. y Crossman A. R. (1989). Neural mechanism underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Neuroscience. 32, 213-226.
- Mitsuo K. y Schwartz J. P. (1992). Somatostatin content increases following norepinephrine depletion in frontal cortex of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. J Neurochem. 59, 267-272.
- Miyake H. y Chiueh C. C. (1989). Effects of MPP+ on the release of serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid from rat striatum in vivo. Eur J Pharmacol. 166, 49-55.
- Mizuno Y., Sone N. y Saitoh T. (1987a). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. J Neurochem. 48,

1787-1793.

Mizuno Y., Suzuki K., Sone N. y Saitoh T. (1987b). Inhibition of ATP synthesis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in isolated mitochondria from mouse brain. Neurosci Lett. 81, 204-208.

Mizuno Y., Saitoh T. y Sone N. (1987c). Inhibition of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. Biochem Bioph Res Commun. 143, 971-976.

Moratalla R., Quinn B., DeLanney L. E., Irwin I., Langston W. y Garybiel A. M. (1992). Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Proc Nat Acad Sci USA. 89, 3859-3863.

Mytilineou C., Cohen G. y Heikkila R. E. (1985). 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) is toxic to mesencephalic dopamine neurons in culture. Neurosci Lett. 57, 19-24.

Nakano I. y Hirano A. (1984). Parkinson's disease: neuron loss in the nucleus basalis without concomitant Alzheimer's disease. Ann Neurol. 15, 415-418.

Namura I., Douillet P., Sun C. J., Pert A., Cohen R. M. and Chiueh C. C. (1987). MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridine) is a neurotoxin to dopamine-, norepinephrine- and serotonin-containing neurons. Eur J Pharmacol. 136, 31-37.

Nauta W. J. H. y Domesick V. B. (1984). Afferent and efferent

- relationships of the basal ganglia. En: Functions of the basal ganglia. (Ciba foundation symposium eds.). Pitman Publishing Ltd. 3-23.
- Nissbrandt H., Sundström E., Jonsson G., Hjorth S. y Carlsson A. (1989). Synthesis and release of dopamine in rat brain: Comparison between substantia nigra pars compacta, pars reticulata, and striatum. J Neurochem. 52, 1170-1181.
- Okada M., Yokotani K., Yamashita M., Ikeda H. y Osumi Y. (1989). Central depletion of dopamine in rats by 1-methyl-4-phenylpyridine. Life Sci. 45, 391-399.
- Ozaki N., Nakahara D., Kaneda N., Kiuchi K., Okada T., Kasahara Y. y Nagatsu T. (1987). Acute effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) on dopamine and serotonin metabolism in rat striatum as assayed in vivo by a microdialysis technique. J Neural Transm. 70, 241-250.
- Pai K. S. y Ravindranath V. (1991). Protection and potentiation of MPTP-induced toxicity by cytochrome P-450 inhibitors and inducers: in vitro studies with brain slices. Brain Res. 555, 239-244.
- Palombo E., Porrino L., Bankiewicz K. S., Crane A. M., Solokoff L. y Irwin J. K. (1990). Local cerebral glucose utilization in monkeys with hemiparkinsonism induced by intracarotid infusion of the neurotoxin MPTP. J Neurosc. 10, 860-869.
- Pasik P., Pasik T. and Holstein G. R. (1991). The ultrastructural chemoanatomy of the basal ganglia: 1984-1989. II. The pallidum, substantia nigra and subthalamic nucleus. En: The

- Basal ganglia III. Advances in behavioral biology. Vol. 39. (Bernardi G., Carpenter M.B., Di Chiara G., Morelli M. y Stanzione P. eds.). Plenum Press. 119-131.
- Pérez-Ontaño I., Herrero M. T., Oset C., De Ceballos M. L., Luquin M. R., Obeso J. A. y Del Río J. (1991). Extensive loss of brain dopamine and serotonin induced by chronic administration of MPTP in the marmoset. Brain Res. 567, 127-132.
- Perlmutter J.S., Kilbourn M. R., Raichle M. E. y Welch M. J. (1987). MPTP-induced up-regulation of in vivo dopaminergic radioligand-receptor binding in humans. Neurology. 37, 1575-1579.
- Playfer J. (1989): Parkinson's disease and other parkinsonian syndromes. En: The clinical neurology of old age. (Tallis R. eds.). John Willey & sons, 127-139.
- Pycock C. J. (1980). Turning behaviour in animals. Neuroscience. 5, 461-514.
- Quinn N. P. (1987). Levodopa. En: Handbook of Parkinson's disease. (Koller W. C. eds.). Marcel Dekker. 317-338.
- Ramsay R. R., Dadgar J., Trevor A. J. y Singer T. P. (1986). Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. Life Sci. 39, 581-588.
- Reavill C., Jenner P., Leigh N. y Marsden (1979). Turning behaviour induced by injection of muscimol or picrotoxin into the substantia nigra demonstrates dual GABA components.

Neurosci Lett. 12, 323-328.

Reavill C., Jenner P. y Marsden C. D. (1984). τ -Aminobutyric acid and basal ganglia outflow pathways. En: Funcnios of the basal ganglia. (Ciba foundation symposium eds.). Pitman Publishing Ltd. 164-171.

Reeves W. J. y Fimognari G. N. (1966). L-Lactic dehydrogenase: Heart (H₄). En: Methods in enyzymology. Vol IX, Carbohydrate metabolism. (Wodd W. A. ed.) Academic Press. 288-294.

Riachi N. J., Lamanna C. y Harik S. (1989). Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine into the rat brain. J Pharm and Exp Ther. 249, 744-748.

Rinne J. O., Rummukainen J., Paljarvi L, Sako E., Molsa P. and Rinne U.K., (1989). Neuronal loss in the substantia nigra in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease in relation to extrapiramidal symptoms and dementia. En: Alheimer's disease and related disorders. Progress in clinical and biological research. (Iqbal K., Wisniewski H. y Winblad B. eds.). Alan R. Liss, 325-332.

Robertson G. S. y Robertson H. A. (1987). D1 and D2 dopamine agonist synergism: separate sites of action?. TIPS. 8, 295-299.

Robertson G. S. y Robertson H. A. (1989). Evidence that L-Dopa-induced rotational behavior is dependent on both striatal and nigral mechanism. J Neurosc. 9, 3326-3331.

Robertson R. G., Clarke C. A., Boyce S., Sambrook M. A. y Crossman A. R. (1990). The role of striatopallidal neurones

utilizing gamma-aminobutyric acid in the pathophysiology of MPTP-induced Parkinsonism in the primate: evidence from (³H) flunitrazepam autoradiography. Brain Res. 531, 95-104.

Robertson H. A. (1992). Dopamine receptor interactions: some implications for the treatment of Parkinson's disease. TINS. 15, 201-206.

Rollema H., Damsma G., Horn A. S., De Vries J. B. y Westerink B. H. C. (1986). Brain dialysis in conscious rats reveals an instantaneous massive release of striatal dopamine in response to MPP+. Eur J Pharmacol. 126, 345-346.

Rollema H., De Vries J. B., Damsma G., Westerink H. C., Kranenborg G. L., Kurh W. G. y 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.

Ruebi J. C., Iversen L. L. y Jessel T. M. (1977). Dopamine selectively increased ³H-GABA release from slices of rat substantia nigra in vitro. Nature. 268, 652-654.

Russ H., Mihatsch W., Gerlach M., Riederer P. y Przuntek H. (1991). Neurochemical and behavioural features induced by chronic low dose treatment with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the common marmoset: implications for Parkinson's disease?. Neurosci Lett. 123, 115-118.

Sanchez-Ramos J. R., Michel P., Weiner W. J. y Hefti F. (1988).

- Selective destruction of cultured dopaminergic neurons from fetal rat mesencephalon by 1-methyl-4-phenylpyridinium: Cytochemical and morphological evidence. J Neurochem. 50, 1934-1944.
- Sandyk R. (1988). Mechanisms of recovery in MPTP-induced parkinsonism. Neuroscience. 27, 727-729.
- Santiago M., Rollema H., De Vries J. B. y Westerink B. H. C. (1991a). Acute effects of intranigral application of MPP+ on nigral and bilateral striatal release of dopamine simultaneously recorded by microdialysis. Brain Res. 538,226-230.
- Santiago M., Westerink B. H. C. y Rollema H. (1991b). Responsiveness of striatal dopamine release in awake animals after chronic 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced lesions of substantia nigra. J Neurochem. 56, 1336-1342.
- Scotcher K. P., Irwin I., DeLanney L. E., Langston J. W. y Di Monte D. (1991). Mechanism of accumulation of the 1-methyl-4-phenylpyridinium species into mouse brain synaptosomes. J Neurochem. 56, 1602-1607.
- Schapiro A. H. V., Mann V. M., Cooper J. M., Dexter D., Daniel S. E., Jenner P., Clark J. B. y Marsden C. D. (1990). Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 Reductase (Complex I) deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem. 55, 2142-2145.
- Scheel-Krüger J., Arnt J. y Magelund G. (1977). Behavioural stimulation induced by muscimol and other GABA agonists

- injected into the substantia nigra. Neurosci Lett. 4, 351-356.
- Schwartzman R. J. y Alexander G. M. (1985). Changes in the local cerebral metabolic rate for glucose in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) primate model of Parkinson's disease. Brain Res. 358, 137-143.
- Sibley D. R., Monsma F. J., McVittie L. D., Gerfen C. R., Burch R. M. y Mahan L. C. (1992). Molecular neurobiology of dopamine receptor subtypes. Neurochem Int. 20, Suppl. 17S-22S.
- Silbergeld E. K. y Walters J. R. (1979). Synaptosomal uptake and release of dopamine in substantia nigra: Effects of τ -aminobutyric acid and substance P. Neurosci Lett. 12, 119-126.
- Sirinathsinghji D. J. S. (1985). Behavioural effects in the rat after acute unilateral intranigral infusions of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Brain Res. 339, 366-370.
- Sirinathsinghji D. J. S., Heavens R. P., Beresford I. J. M. y Hall M. D. (1988). Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP+ into the nigrostriatal dopamine pathway-I. Behavioural, neurochemical and histological characterization of the lesion. Neuroscience. 27, 117-128.
- Smith R. D., Zhang Z., Kurlan R., McDermott M. y Gash D. M. (1993). Developing a stable bilateral model of parkinsonism in Rhesus monkeys. Neuroscience. 52, 7-16.
- Sonsalla P. K., Zeevalk G. D., Manzino L., Giovanni A. y Nicklas

- W. J. (1992). MK-801 fails to protect against the dopaminergic neuropathology produced by systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice or intranigral 1-methyl-4-phenylpyridinium in rats. J Neurochem. 58, 1979-1982.
- Stocchi F., Ruggieri S., Carta A., Jenner P. y Agnoli A. (1989). Different therapeutic approaches to complicated Parkinson's disease. En: Disorders of movement (Quinn N. P. and Jenner P. G. eds.). Academic Press, 567 pp.
- Studler J. M., Javoy-Agid F., Cesselin F., Legrand J. C. y Agid Y. (1982). CCK-8-Immunoreactivity distribution in human brain: selective decrease in the substantia nigra from parkinsonian patients. Brain Res. 243, 176-179.
- Sun C. J., Johannessen J. N., Gessner W., Namura I., Singhaniyom W., Brossi A. y Chiueh C. C. (1988). Neurotoxic damage to the nigrostriatal system in rats following intranigral administration of MPDP+ and MPP+. J Neural Transm. 74, 75-78.
- Takada M., Li Z. K. y Hattori T. (1987). Intracerebral MPTP injections in rat cause cell loss in the substantia nigra, ventral tegmental area and dorsal raphe. Neurosci Lett. 78, 145-150.
- Takada M., Campbell K. J. y Hattori T. (1991). Regional localization of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) uptake: mismatch between its uptake and neurotoxic sites. Neurosci Lett. 133, 137-140.

- Tapia R. (1983). γ -Aminobutyric acid metabolism and biochemistry of synaptic transmission. En: Handbook of Neurochemistry. Vol 3 (Latjtha A. ed.). Plenum Press, New York. 423-446.
- Tapia R. y Flores-Hernández J. (1990). Circling behavior induced by intranigral administration of ruthenium red and 4-aminopyridine in the rat. Neuroscience. 39, 657-663.
- Tapia R. y Jasso D. (1991). Turning behavior and depletion of glutamate decarboxylase induced by intranigral microinjection of MPP+ in the rat. J Neurochem (Suppl), S150-B.
- Tapia R. y Salazar P. (1991). Glutamate decarboxylase activity in the substantia nigra and the hippocampus of rats microinjected with inhibitors of the enzyme. Neurochem Res. 16, 263-267.
- Taqet H., Javoy-Agid F., Hamon M., Legrand J. C., Agid Y. y Cesselin F. (1983). Parkinson's disease affects differently Met⁵- and Leu⁵-enkephalin in the human brain. Brain Res. 280, 379-382.
- Turski L., Bressler K., Rettig K. J., Loschmann P. A. y Wachtel H. (1991). Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl- D-aspartate antagonists. Nature. 349, 414-418.
- Tyler K. L. (1987). A history of Parkinson's disease. En: Handbook of Parkinson's disease. (Koller W. C. eds.). Marcel Dekker. 1-34.
- Ueki A., Chong P. N., Albanese A., Rose S., Chivers J. K., Jenner

- P. y Marsden C. D. (1989). Further treatment with MPTP does not produce parkinsonism in marmosets showing behavioural recovery from motor deficits induced by an earlier exposure to the toxin. Neuropharmacology. 28, 1089-1097.
- Ungerstedt U. (1971). Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. Acta Physiol Scand (Suppl). 367: 49-68.
- Vincent S., Hokfelt T., Chistensson I. and Terenius L. (1982). Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. Eur J Neurosc. 85, 251-252.
- Waters C. M., Hunt S. P., Jenner P. y Marsden C. D. (1987). An immunohistochemical study of the acute and long-term effects of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the marmoset. Neuroscience. 23, 1025-1039.
- Wisden W. y Seeburg P. H. (1992). GABA_A receptors channels: from subunits to functional entities. Current Opinion in Neurobiology. 2, 263-269.
- Wooten G. F. (1987). Neurochemistry. En: Handbook of Parkinson's disease. (Koller W. C. eds.). Marcel Dekker. 237-251.
- Yamamoto C. y Kawana E. (1991). Immunohistochemical detection of GABA in rat striatum by intraperitoneal injection of MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). Okajimas Folia Anat Jpn. 68, 271-282.
- Zigmond M. J. y Stricker E. M. (1989). Animals models of Parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic applications. Int Rev neurobiol. 31, 2-79.