



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE PRIMATES
PARKINSONICOS SOMETIDOS A TERAPIA GÉNICA
O LEVODOPA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

AURELIO CAMPOS ROMO

DIRECTOR DE TESIS: DR JUAN FERNÁNDEZ RUIZ

MÉXICO DF 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

COMITÉ TUTORAL

DR. JOSÉ SEGOVIA VILA

DRA. LETICIA SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ

MIEMBROS DEL JURADO

DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO

DR. JUAN FERNÁNDEZ RUIZ

DR. STEFAN MIHAILESCU M.

DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ

DR. BENJAMÍN FLORAN

Dedicatorias

A mis Padres por su amor, por enseñarme a vivir y darme la oportunidad de llegar a ser lo que soy.

A Diana por tu amor, comprensión y ternura que me dan fuerza todos los días. Gracias por compartir tu vida conmigo.

A Enrique por crecer conmigo y darme todo tu amor y cariño.

**"Ves cosas y dices, ¿Por qué?
Pero yo sueño cosas que nunca
fueron y digo, ¿Por qué no?".**

George Bernard Shaw

Agradecimientos

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme el privilegio ser parte de ella y formarme como médico e investigador.

Al Dr. Juan Fernández por su guía y su muy especial forma de enseñarme a hacer ciencia.

Gracias a la Dra. Leticia Verdugo y el Dr. José Segovia por su orientación y consejos.

A los miembros del jurado por sus comentarios y sugerencias y a mis profesores que me han acompañado desde el principio.

A mis amigos que han estado y están en el laboratorio en especial a Rafael por recorrer este camino conmigo.

A mis hermanos Octavio y Alejandro con los que he crecido y me han enseñado tanto.

A mis colegas médicos con quienes inicie el apasionante camino del estudio del cuerpo humano.

A todos mis monos.

Contenido

I.	RESUMEN	1
II.	ABSTRACT	3
III.	ABREVIATURAS	4
1.	INTRODUCCIÓN	6
1.1	Enfermedad de Parkinson	6
	Cuadro Clínico	6
	Epidemiología	6
	Causas y patogénesis	7
	Mecanismos de neurodegeneración	10
	Fisiopatología	11
	Tratamiento	20
1.2	Dopamina	23
	Biosíntesis de dopamina	23
	Almacenamiento, liberación y recaptura de dopamina	24
	Degradación de dopamina	24
1.3	Modelo de MPTP en primates no humanos	25
1.4	Evaluación de Modelos animales de enfermedad de Parkinson	27
	Artículo 1: Evaluación de alteraciones motoras en modelos animales de enfermedad de Parkinson	28
2.	ANTECEDENTES	29
2.1	Otras aproximaciones terapéuticas	29
	Trasplantes de médula adrenal	30
	Trasplantes de mesencéfalo fetal humano	33
	Trasplante de mesencéfalo embrionario porcino	37
	Trasplante de células retinianas microencapsuladas	38
	Trasplante de agregados celulares del cuerpo carotídeo	38
	Trasplante de células modificadas genéticamente (terapia génica <i>ex vivo</i>)	41
	Trasplante de células troncales	42
	Terapia génica <i>in vivo</i>	44
2.2	Factores neurotróficos	45
2.3	Astrocitos	46
3.	PLANTEAMIENTO	48
4.	OBJETIVOS GENERALES	48
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	49

Artículo 2: Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian primates in the HALLWAY task.....	50
7. TERAPIA GÉNICA.....	51
<i>Artículo 3: (manuscrito) Behavioral improvement in MPTP-treated nonhuman primates in the HALLWAY task after transduction of TH cDNA in astrocytes</i>	52
8. DISCUSIÓN.....	53
9. CONCLUSIONES.....	58
IV. REFERENCIAS.....	59

EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE PRIMATES PARKINSONICOS SOMETIDOS A TERAPIA GÉNICA O LEVODOPA

I. RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo progresivo caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNc). Esto da como resultado una deficiencia de dopamina (DA) en el cuerpo estriado, que principalmente se manifiesta con alteraciones motoras. Un modelo experimental de esta enfermedad se obtiene mediante la administración de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en primates no humanos. En este trabajo, desarrollamos un nuevo método cuantitativo de evaluación basado en el uso de grabaciones en video con la finalidad de medir el desempeño motor de los primates en libre movimiento de un modo más objetivo. Así mismo utilizando este novedoso sistema, evaluamos el efecto de un tratamiento con terapia génica, que consiste en el uso de astrocitos como plataforma, los cuales son modificados genéticamente con un vector que expresa el cDNA que contiene toda la región que codifica a la enzima tirosina hidroxilasa (TH). La expresión de la TH está controlada mediante el promotor del gen codificador para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), activo en astrocitos. La transfección del cDNA se realiza mediante el método de lipofección. Para evaluar el efecto del transgen se entrenaron en la tarea conductual cuatro monos Vervet (*Cercopithecus aethiops*) antes de que fueran tratados con una inyección de MPTP (0.5 mg/kg intramuscular) diariamente por 5 días. Se filmaron desde tres perspectivas diferentes en un pasillo de observación conductual durante la realización de la tarea, antes y después de la intoxicación de MPTP, durante el tratamiento con Levodopa/Carbidopa vía oral (15/1.5 mg/kg) diariamente, se realizó una línea base tras lavar la Levodopa/Carbidopa y finalmente después haber recibido la terapia génica. Los videos fueron editados y analizados usando una computadora. Para el análisis, se cuantificó el tiempo de traslación a través del pasillo, tiempo de alcance y tiempo de ingestión, el número de intentos para obtener recompensas, el número de recompensas obtenidas, y la repisa más alta para alcanzar las recompensas. Después de la administración de MPTP, los tiempos de traslación alcance e ingestión, el número de intentos y las recompensas totales obtenidas fueron significativamente diferentes comparados a las medidas basales. Después de la administración de Levodopa/Carbidopa, al igual que tras la administración de la terapia génica, se observó una mejora significativa. Los resultados actuales demuestran que el sistema de evaluación en el pasillo, es un método sensible y objetivo para la evaluación del comportamiento detallado del modelo de la EP. Del mismo modo, la terapia génica

utilizando los astrocitos como plataforma resulta ser adecuada para la expresión de proteínas a nivel cerebral, además de generar una mejoría conductual en el modelo de MPTP en primates.

BEHAVIORAL EVALUATION OF PARKINSONIC PRIMATES AFTER GENE THERAPY OR LEVODOPA

II. ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc), resulting in a lack of dopamine (DA) in the striatum, causing motor impairments among other deficits. An experimental model of this disease is obtained by the administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxin in nonhuman primates. In this work, we developed a new quantitative evaluation method based on the use of video recordings to measure the motor performance of primates on free movement conditions in a more objective way. Also, using this new system we assessed the effect of gene therapy treatment, which is based on the use of endogenous astrocytes, which were genetically modified with a vector expressing cDNA containing the entire coding region of tyrosine hydroxylase (TH). The expression of TH was controlled by the promoter of the gene coding for glial fibrillary acidic protein (GFAP). Transfection with cDNA was performed using lipofection. We trained four vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) in the behavioral task before they were treated with an injection of MPTP (0.5 mg/kg intramuscular) daily for 5 days. The monkeys were filmed while performing the hallway task from three different perspectives, both before and after MPTP intoxication, during treatment with Levodopa/Carbidopa via oral (15/1.5mg/kg/day). A baseline was carried out after wash Levodopa/Carbidopa, and finally after receiving gene therapy. The videos were edited and analyzed using a computer. The behavioral aspects that were measured and analyzed were displacement time across the hallway, reaching time towards rewards, ingestion time, number of attempts to obtain rewards, number of rewards obtained, and level of the highest shelf reached. The results show that after MPTP administration displacement and ingestion time, number of attempts and total rewards obtained were significantly different compared to the baseline, after administration of Levodopa/Carbidopa, a significant improvement was observed, as well as after the administration of gene therapy. Our results show that the hallway task is a sensitive and objective method for evaluating the detailed behavior of the PD model. Our results also show that gene therapy using astrocytes as a platform is suitable for the expression of proteins in the brain. Moreover, gene therapy generates a behavioral improvement in the MPTP primate model.

III. Abreviaturas

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
AHV	Ácido homovanílico
BDNF	Factor neurotrófico derivado de Cerebro
BH4	Tetrahidrobiopteridina
CAPIT	Core Assessment Program for Intracerebral Transplantations
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
DA	Dopamina
DAA	Descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos
DAG	Descarboxilasa de ácido glutámico
DAT	Transportador de dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacetico
EP	Enfermedad de Parkinson
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FMT	Fluoro-L-m-tirosina
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
GB	Ganglios basales
GDNF	Factor neurotrófico derivado de glía
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GTP	Guanidil trifosfato
IGF	Factor de crecimiento análogo a insulina
L-dopa	Hidroxi-L-fenilalanina
MAO	Monoamina-oxidasa
MAO-B	Monoamina-oxidasa-B
MPDP+	1-metil-4-fenil-1,2,3-dihidropiridium
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NF-4	Neurotrofina 4
NFG	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NST	Núcleo subtalámico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PET	Tomografía por emisión de positrones
SNC	Sistema nervioso central

SNc	Sustancia negra pars compacta
SNr	Sustancia negra pars reticulada
SPECT	Tomografía computada por emisión de fotón único
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TH	Tirosina hidroxilasa
UPDRS	United Parkinson Disease Rating Scale
VMAT2	Transportador de monoaminas vesiculares de tipo 2

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por James Parkinson en 1817 en su trabajo "An Essay on The Shaking Palsy" o la parálisis agitante. En ese trabajo describió la enfermedad principalmente en sus componentes motores, hoy día sabemos que no se trata exclusivamente de una enfermedad motora sino que existen también alteraciones del sueño, neuropsiquiátricas, autonómicas y cognitivas.

Cuadro Clínico

La EP es caracterizada clínicamente por la tríada clásica integrada por temblor, que es generalmente en reposo, rigidez a movimientos pasivos, y bradicinesia, que se caracteriza por dificultad para iniciar los movimientos o ejecutar movimientos repentinos. Otros síntomas son alteraciones posturales, pérdida de expresión facial, y alteraciones en la marcha y el equilibrio.

Epidemiología

La prevalencia de la EP en países industrializados se estima en 0.3% de la población general y cerca del 1% de la población mayor a 60 años (Rajput, 1992; deRijk et al., 2000). Personas de todos los orígenes étnicos pueden ser afectadas, y los varones tienen una incidencia ligeramente mayor que las mujeres para esta enfermedad (Baldereschi et al., 2000; Lai et al., 2003). La edad media para su aparición se estimaba en los últimos años de la sexta década de la vida (Hoehn y Yahr, 1967), sin embargo actualmente se piensa que en promedio aparece de principios a mediados de la séptima década de la vida (Inzelberg et al., 2002). Las personas que presentan la enfermedad tempranamente suelen iniciar con el primer síntoma entre los 21 y los 40 años, en algunos casos pueden ser hasta los 50, mientras que las que inician de forma juvenil pueden tener su primer síntoma antes de los 20 años (Muthane et al., 1994). El padecimiento de aparición temprana afecta entre el 5-10% de los pacientes (Golbe, 1991).

En México no existen estudios epidemiológicos de la EP. Sin embargo, médicos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, estiman que la prevalencia nacional debe encontrarse entre 40 y 50/100,000 habitantes, es decir alrededor de 50,000 pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática en todo el país (Otero-Siliceo et al., 1996).

Causas y patogénesis

El hallazgo principal en la EP es el daño en las neuronas dopaminérgicas de proyección de la sustancia negra pars compacta (SNc) al núcleo caudado y putamen (juntos forman el cuerpo estriado). Se encuentran como hallazgo patológico de esta enfermedad cuerpos de Lewy, que son inclusiones intracitoplasmáticas de 5-25 μm de diámetro compuestos por filamentos y material granular rodeados de filamentos orientados radialmente. Se han identificado varias proteínas en los cuerpos de Lewy, entre las cuales están la ubiquitina y la α -sinucleína que es la más abundante, también se encuentran neuritas de Lewy que son neuritas anormales que contienen filamentos similares a los encontrados en los cuerpos de Lewy (Spillantini et al., 1998). Los signos clínicos son evidentes cuando cerca del 80% de la dopamina (DA) estriatal y el 50% de las neuronas nigrales se pierden (Fearnley y Lees, 1991). Los cuerpos de Lewy no se encuentran confinados a la sustancia negra y sus proyecciones, sino que pueden encontrarse en corteza, amígdala, locus ceruleus, núcleo del vago, y en el sistema nervioso autónomo periférico (Braak et al., 2003; Wakabayashi y Takahashi, 1997). Los cuerpos de Lewy en estas áreas no motoras pueden contribuir con los síntomas no motores de la enfermedad.

Con excepción de los individuos con la EP que se sabe tienen una mutación genética o que han sido expuestos a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la causa directa de la enfermedad se desconoce. Se piensa que probablemente es resultado de múltiples factores, actuando de forma conjunta, incluyendo envejecimiento, susceptibilidad genética y exposiciones ambientales (Steece-Collier et al., 2002)

Envejecimiento

Patológicamente, el envejecimiento está asociado con una disminución de las neuronas pigmentadas de la SNc (McGeer et al., 1977) incidentalmente se han reportado cuerpos de Lewy en un 16% de ancianos asintomáticos durante su autopsia (Fearnley y Lees, 1991). Estudios de tomografía por emisión de positrones o (PET por sus siglas en inglés) usando ^{18}F -DOPA, han mostrado una sutil disminución en la recaptura de ^{18}F -DOPA relacionada con la edad (Cordes et al., 1994). En un estudio de tomografía computada por emisión de fotón único (SPECT por sus siglas en inglés) se reportó una disminución estriatal de transportadores de dopamina (DAT) en relación con la edad, pero no se encontró ninguna diferencia entre el caudado y el putamen, patrón que difiere de lo observado en la EP (van Dyck et al., 2002). Aunque la incidencia de la EP aumenta con la edad, en general es aceptado que no se trata simplemente de un envejecimiento acelerado.

Predisposición genética

Aunque la mayoría de las personas con EP no cuentan con antecedentes familiares para este padecimiento, cerca del 15% de los pacientes tienen un familiar en primer grado con la enfermedad (Payami et al., 1994). Se han descubierto 9 locis genéticos asociados con parkinsonismo de transmisión autosómica dominante o recesiva (Tabla I). Sin embargo, exposiciones ambientales pueden estar involucradas en patrones familiares también (Calne et al., 1987).

Locus del gen	Locus cromosoma	Producto del gen	Transmisión
PARK 1(SNCA)	4q21.3	α sinucleína	Dominante
PARK 2	6q25.2-q27	Parkin	Recesiva
PARK 3	2p13	Desconocido	Dominante
PARK 4	4p15	Desconocido	Dominante
PARK 5 (UCHL1)	4p14	UCHL1	Dominante
PARK 6	1p35-p36	PINK1	Recesiva
PARK 7	1p36	Proteína DJ1	Recesiva
PARK 8	12p11.2-q13.1	Desconocido	Dominante
PARK 10	1p32	Desconocido	Dominante

Tabla I. Locis asociados con parkinsonismo y su tipo de transmisión.

En la mayoría de los estudios realizados en gemelos monocigóticos, no se han encontrado concordancias en casos donde la aparición de la EP ocurre después de los 50 años, pero la concordancia es completa si el inicio ocurre antes de esa edad (Tanner et al., 1999).

El descubrimiento de 5 genes y 4 otros loci relacionados con la EP familiar, ha aumentado el interés sobre la contribución genética a este desorden. Las anomalías en un solo gen como causa directa de la enfermedad se han identificado solo en algunos pocos casos (Gasser, 2001), sin embargo el descubrimiento de estos genes y sus productos ha expandido nuestra comprensión de los potenciales mecanismos de neurodegeneración, tanto en la presentación familiar como en la idiopática de la EP

Exposiciones ambientales

El MPTP es el único agente ambiental que se ha asociado directamente con el desarrollo de un parkinsonismo reactivo a levodopa, el cual es clínicamente indistinguible de la EP idiopática. Sin embargo, se ha observado que la exposición a manganeso puede causar neurotoxicidad y un síndrome neurológico que se asemeja a la EP. La evidencia actual indica que el parkinsonismo inducido por manganeso se diferencia de la enfermedad idiopática principalmente por su predilección por acumularse y dañar los globos pálidos y el estriado en vez de la SNc. Aunque clínicamente el síndrome responde a levodopa, estudios de imagen con resonancia magnética y PET así como sus características patológicas, ayudan a diferenciar ambas patologías (Olanow, 2004). También se han relacionado metales como zinc, hierro y cobre con la EP. Se ha observado que el zinc y el hierro se encuentran elevados en la SNc de pacientes con EP mientras que el cobre se encuentra disminuido. El mecanismo de estos cambios no se comprende totalmente, sin embargo, la elevación de hierro en particular puede contribuir con el estrés oxidativo y la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc así como con el depósito de cuerpos de inclusión intracelular (Barnham y Bush, 2008). Por otro lado, tanto la exposición a pesticidas en áreas rurales (en países industrializados), como el tomar agua de pozos, se han relacionado también con la EP (Priyadarshi et al., 2001). Del mismo modo, ciertas exposiciones ambientales se han relacionado con una disminución en el riesgo de padecer la enfermedad, como por ejemplo, el consumo de cigarrillos (Morens et al., 1995). En este sentido, también se encontró que la ingesta de cafeína proveniente del café o de otras fuentes, tiene una relación inversa con la presentación de la enfermedad (Ross et al., 2000). Agentes infecciosos se han sugerido como causantes de la enfermedad (Yamada et al., 1996; Pradhan et al., 1999; Tsui et al., 1999). La epidemia de encefalitis letárgica que fue temporalmente correlacionada con la pandemia de influenza en 1918, dio pie a presumir que existía una asociación, ya que algunos de los individuos afectados, desarrollaron un parkinsonismo postencefalítico, sin embargo esta entidad es tanto clínica como patológicamente distinta de la EP idiopática (Gamboa et al., 1974; Casals et al., 1998).

Mecanismos de neurodegeneración

La neurodegeneración puede estar relacionada con alteraciones mitocondriales, estrés oxidativo, excitotoxicidad, apoptosis e inflamación (Samii y Calne, 1999). El descubrimiento de mutaciones en genes que codifican para α sinucleína, parkin, y la ubiquitin-C-terminal hidrolasa L1, en EP familiar, sugiere que una falla en el sistema

ubiquitin-proteosoma es una vía común de esta neurodegeneración (McNaught et al., 2001).

Las moléculas de ubiquitina normalmente se unen a proteínas dañadas, como señal para su degradación. Los complejos ubiquitin-proteína se degradan mediante el proteosoma 26S, el cual, es una proteasa con múltiples subunidades. Una mutación en la α -sinucleína causa la agregación y resistencia a la degradación de la proteína por el sistema ubiquitin-proteosoma (Goedert, 2001).

La proteína parkin es una ligasa de ubiquitina que cataliza la unión de la ubiquitina con las proteínas destinadas a ser degradadas. Las cadenas de poliubiquitina que se liberan de las proteínas degradadas, se desensamblan nuevamente en monómeros de ubiquitina por la hidrolasa de ubiquitina C-terminal L1, para reingresar en el ciclo.

Mutaciones en la parkin y la hidrolasa de ubiquitina C-terminal L1, parecen interferir con la degradación normal de proteínas. Los cuerpos de Lewy contienen varias proteínas que probablemente estaban destinadas a ser degradadas, y que sin embargo esto no ocurrió (McNaught et al., 2001). La SNc de los pacientes con EP, contienen grandes cantidades de proteínas oxidadas y nitradas que son resistentes a la degradación proteosomal (Halliwell y Jenner, 1998). Del mismo modo, una gran concentración de proteínas nitradas sugiere también una contribución a la excitotoxicidad. (Good et al., 1998). Una reducción en la actividad del complejo 1 mitocondrial en la SNc de pacientes con EP (Good et al., 1998) puede producir un aumento de radicales libres que dañan a la célula y no permiten la degradación de proteínas por falta de energía. Por lo tanto, el daño mitocondrial, una deficiencia del complejo 1, estrés oxidativo y excitotoxicidad son consistentes con la hipótesis de que el sistema ubiquitin-proteosoma se encuentre alterado en la EP. Sin embargo el mecanismo exacto mediante el cual, una acumulación anormal de proteínas provoca la muerte neuronal, se desconoce.

Fisiopatología

En los años 70, se creía que los ganglios basales (GB) funcionaban para integrar proyecciones de diversas porciones de la corteza y que proyectaban esta información, vía el tálamo, a la corteza motora y al área motora suplementaria. Este esquema proporcionó un modelo mediante el cual, la iniciación del movimiento podría originarse en diversas áreas funcionales corticales. Más recientemente estudios neurofisiológicos y anatómicos han sugerido que la entrada de información a los GB proveniente desde diversas áreas corticales terminan dentro de territorios específicos, los que a su vez, están conectados con porciones específicas del tálamo. Del mismo modo estas áreas

talámicas, proyectan de nuevo a las mismas áreas de la corteza en las cuales se originó el circuito (DeLong y Georgopoulos, 1981; Alexander et al., 1986; Kelly y Strick, 2004) (Figura 1).



Figura1. Esquema de los diferentes circuitos cortico-talámicos provenientes de la corteza, que conectan los GB y el tálamo en sus sitios correspondientes. Las flechas rojas indican conexiones inhibitorias mediadas por ácido- γ -aminobutírico (GABA); las flechas verdes, indican conexiones excitadoras mediadas por glutamato.

Estos circuitos reentrantes segregados son capaces de influir en extensas áreas del lóbulo frontal y desempeñar un papel más amplio, no restringido únicamente a funciones motoras. Los diversos circuitos fueron designados con base en las presuntas funciones de las áreas corticales de las cuales se originan, incluyendo motora, oculomotora, asociativa prefrontal, y áreas límbicas. La organización segregada de estos circuitos se ha corroborado mediante estudios usando transporte retrogrado de partículas virales (Kelly y Strick, 2004). Aunque siga habiendo una cierta incertidumbre en relación con el grado de segregación entre los circuitos y si los circuitos están cerrados o parcialmente abiertos, el esquema ha sido aceptado por la mayoría de los investigadores. Este modelo ha proporcionado un marco para entender las diversas alteraciones conductuales, clínicamente evidentes, en los desórdenes de los GB y una base racional para el diseño de nuevos tratamientos para algunos de estos desórdenes.

Además de la organización topográfica de los circuitos cortico-subcorticales, detalles adicionales de la anatomía de las conexiones intrínsecas y extrínsecas de los GB se han resuelto (Figura 2).

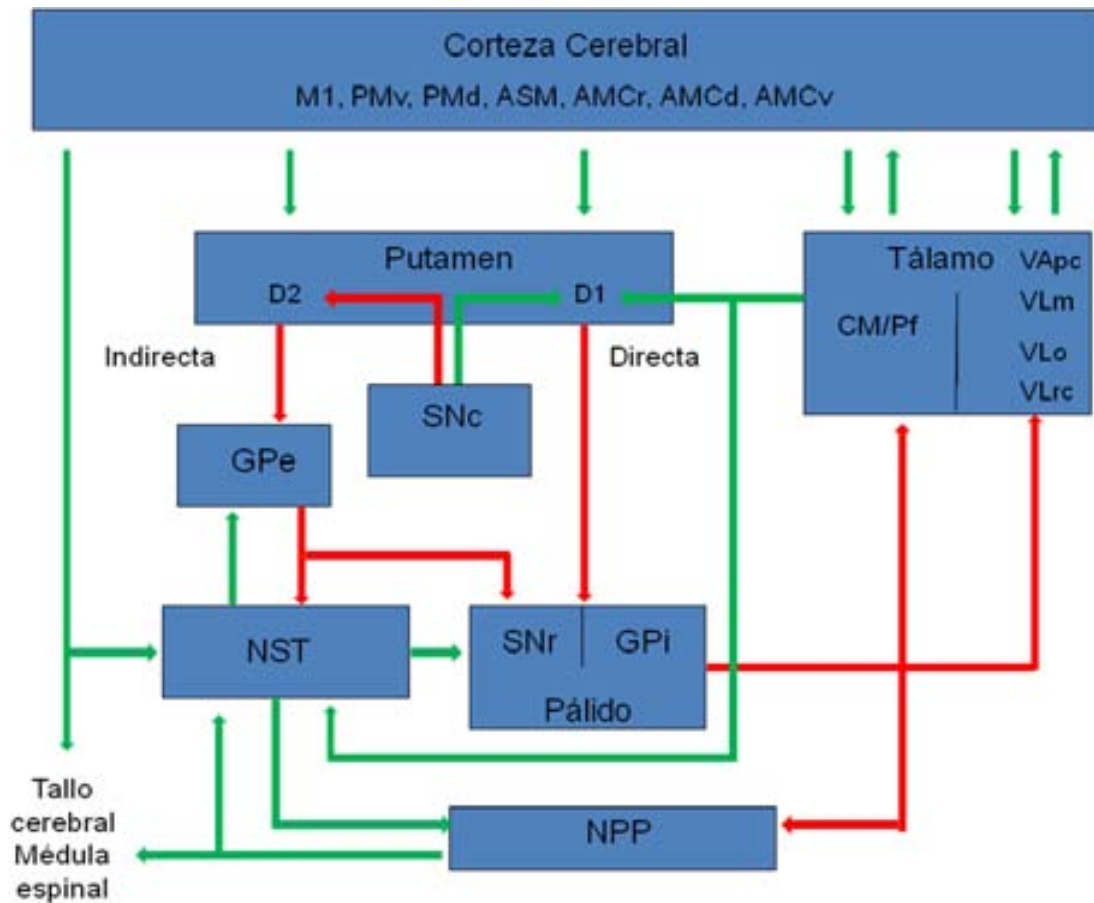


Figura 2. Anatomía del circuito motor. Las áreas corticales motoras dan lugar a un circuito motor específico. Las flechas rojas indican conexiones inhibitoras mediadas por ácido- γ -aminobutírico (GABA); las flechas verdes, indican conexiones excitadoras mediadas por glutamato. M1, indica la corteza motora primaria; PMv, corteza premotora ventral; PMd, corteza premotora dorsal; ASM, área suplementaria motora; AMCr, área motora del cíngulo porción rostral; AMCd, área motora del cíngulo porción dorsal; AMcv, área motora del cíngulo porción ventral; SNc, sustancia negra pars compacta; GPe, globo pálido externo; NST, núcleo subtalámico; GPi, globo pálido interno; SNr, sustancia negra pars reticulada; NPP, núcleo pedunculopontino; Pf, núcleo parafascicular del tálamo; CM, núcleo centromediano del tálamo; VApC, núcleo ventral anterior del tálamo pars parvocelular; VLm, núcleo ventrolateral del tálamo pars medial; VLo, núcleo ventrolateral del tálamo pars oral; VLrC, núcleo ventrolateral del tálamo rostral pars caudal.

El estriado y el núcleo subtalámico (NST) reciben la entrada organizada topográficamente de la corteza cerebral, mientras que el segmento interno del globo pálido (GPi) y la sustancia negra pars reticulada (SNr) proporcionan la salida de los GB hacia el tálamo y el tallo cerebral. Las conexiones entre el estriado y estas estructuras de salida, se organizan en una vía directa monosináptica inhibitora mediada por ácido- γ -aminobutírico (GABA) y una vía indirecta excitadora polisináptica que incluye al globo pálido externo (GPe) y el NST. Las neuronas del estriado que dan

lugar a la vía directa e indirecta, reciben conexiones corticales de diversas fuentes neuronales. Conexiones adicionales hacia las neuronas de la vía directa estriatal, vienen de el núcleo intralaminar del tálamo (los núcleos centromediano y parafascicular). Las neuronas del GPi y de la SNr, dan lugar a las proyecciones GABAérgicas, las cuales, debido a su alta frecuencia de disparo, inhiben tónicamente a las neuronas de proyección tálamo-corticales en los núcleos ventral anterior, ventrolateral, y núcleos intralaminares del tálamo, así como a las neuronas del tallo cerebral. Dada la polaridad de las conexiones implicadas, se piensa que la activación de las neuronas estriatales que dan lugar a la vía directa inhiben al GPi y SNr, mientras que la activación de las neuronas estriatales que dan lugar a la vía indirecta puede ejercer un efecto excitador neto sobre éstos núcleos de salida (DeLong y Wichmann, 2007), (Figura 2).

El circuito cortico-subcortical mas investigado es el motor debido a su importancia para los desórdenes de movimiento (Figura 2). En un sentido general, la salida tónica de este circuito, surge en las porciones motoras del GPi y SNr, y puede regular la cantidad total de movimiento. La salida aumentada de los GB podría traducirse en menos movimiento debido a la inhibición de las neuronas de proyección tálamo-corticales, mientras que una reducción en la salida de los GB podría traducirse en un aumento del movimiento debido a la falta de inhibición de estas neuronas. Aunque no hay evidencia directa, se ha propuesto que la acción combinada de ambas vías puede escalar o enfocar los movimientos (Mink y Thach, 1991). Para alcanzar el escalamiento de los parámetros del movimiento o de la terminación de los movimientos; inicialmente, la salida del estriado inhibe poblaciones neuronales específicas en el GPi y la SNr mediante la vía directa, facilitando el movimiento. Después mediante la entrada de la vía indirecta ocurre la liberación de la inhibición de las mismas neuronas del GPi y de la SNr, inhibiendo el movimiento en curso. En el modelo alternativo de concentración, la inhibición de neuronas palidales y nigrales relevantes mediante la vía directa, permitiría que los movimientos voluntarios procedan, mientras que los movimientos involuntarios serían suprimidos por la concomitante creciente entrada excitadora a otras neuronas del GPi y la SNr mediante la vía indirecta.

El equilibrio entre la vía directa y la indirecta es regulado por la acción diferencial, en las neuronas estriatales, de la DA que proviene de las terminales de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. La liberación de dopamina en el estriado aumenta la actividad a lo largo de la vía directa (actuando sobre los receptores D1 en neuronas estriatales) y reduce la actividad a lo largo de la vía indirecta (actuando sobre los receptores D2). Juntas, estas acciones, dan lugar a una reducción neta en la actividad del GPi y de la SNr (Figura 2). Inversamente, una disminución en la liberación de DA

estriatal resultará en un aumento en la actividad del GPi y la SNr (DeLong y Wichmann, 2007).

El parkinsonismo es un desorden de movimiento caracterizado por la tríada clásica de bradicinesia, temblor en reposo, y rigidez a movimientos pasivos, como resultado de una disminución del tono dopaminérgico en las porciones motoras del putamen. En la EP idiopática, estas características motoras se acompañan a menudo por alteraciones no motoras, tales como, depresión, ansiedad, disfunciones autónomas, desórdenes de sueño, y alteraciones cognoscitivas, que se cree, son resultado de una combinación de deficiencia de DA en las porciones no motoras del estriado y de cambios progresivos más extensos en el tallo cerebral, el tálamo, y la corteza (Braak et al., 2003). Se sabe poco acerca de las consecuencias de la degeneración neuronal extranigral en la EP.

La disminución en los movimientos espontáneos (hipocinesia) y la lentitud de los movimientos voluntarios (bradicinesia) son características fundamentales del fenómeno general de la acinesia en la EP. La evidencia descrita anteriormente indica que la falta de DA altera el equilibrio en la actividad de los GB hacia la vía indirecta, donde el microcircuito de GPe-NST-GPi juega un papel fundamental (Figura 3).

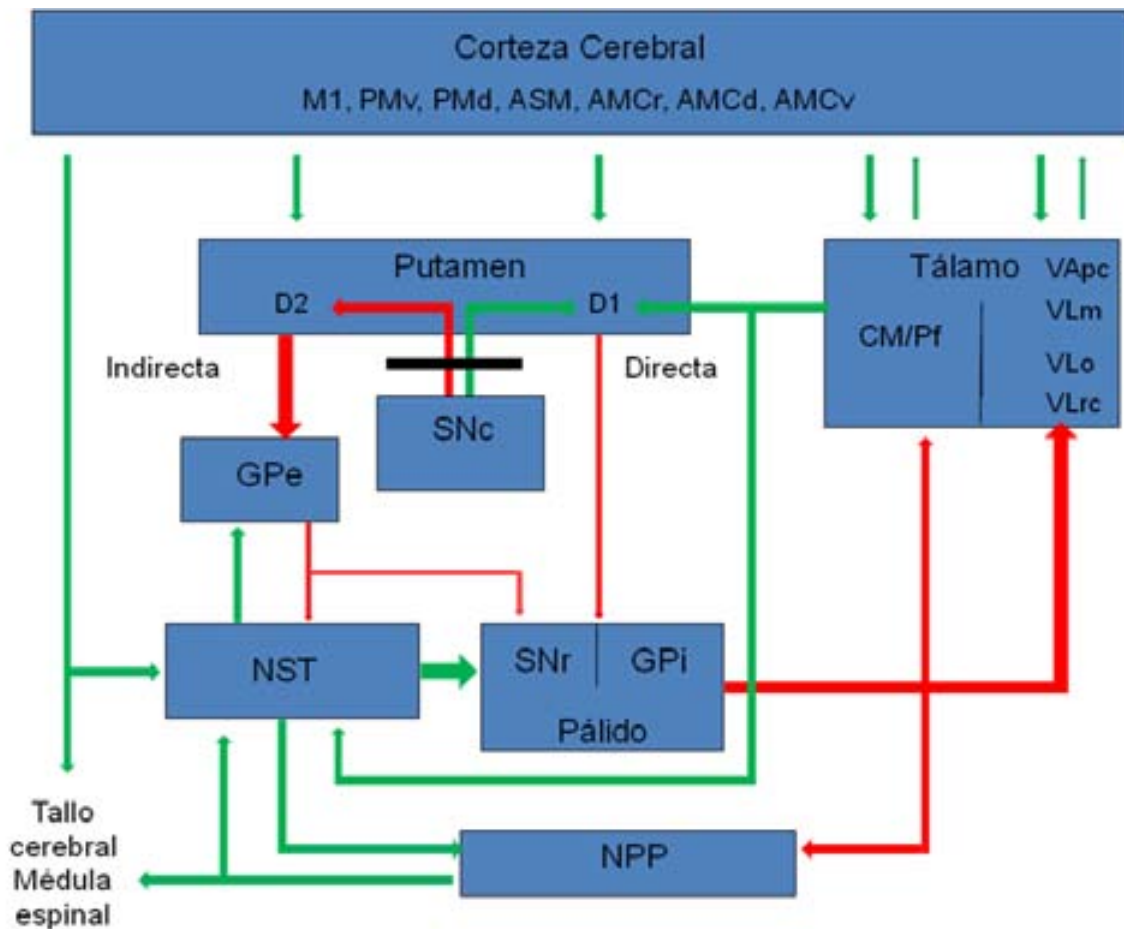


Figura 3. Anatomía del circuito motor en ausencia de DA liberada por la SNc. Se observa una disminución en la inhibición mediada por los receptores D1. Por otro lado en la vía indirecta, se observa un aumento en la inhibición mediada por receptores D2 sobre el GPe. Este núcleo a su vez inhibe menos al NST, lo que da lugar a actividad excitadora incrementada sobre el GPi y la SNr. La combinación de la poca inhibición de la vía directa y la excitación aumentada de la vía indirecta generan un aumento en la inhibición sobre el tálamo y este a su vez disminuye su excitación sobre la corteza. La línea negra es un corte del aporte de DA, las flechas rojas indican conexiones inhibitorias mediadas por ácido- γ -aminobutírico (GABA); las flechas verdes, son conexiones excitadoras mediadas por glutamato. M1, indica la corteza motora primaria; PMv, corteza premotora ventral; PMd, corteza premotora dorsal; ASM, área suplementaria motora; AMCr, área motora del cíngulo porción rostral; AMCd, área motora del cíngulo porción dorsal; AMCv, área motora del cíngulo porción ventral; SNc, sustancia negra pars compacta; GPe, globo pálido externo; NST, núcleo subtalámico; GPi, globo pálido interno; SNr, sustancia negra pars reticulada; NPP, núcleo pedunculopontino; Pf, núcleo parafascicular del tálamo; CM, núcleo centromediano del tálamo; VApc, núcleo ventral anterior del tálamo pars parvocelular; VLm, núcleo ventrolateral del tálamo pars medial; VLo, núcleo ventrolateral del tálamo pars oral; VLcr, núcleo ventrolateral del tálamo rostral pars caudal.

Una salida aumentada del GPi incrementa la inhibición de la proyección tálamo-cortical, reduciendo la activación neuronal asociada con la iniciación del movimiento. Además, el putamen, el NST, y el GPi muestran una respuesta neuronal aumentada como consecuencia de la estimulación periférica con un disparo sincrónico de las neuronas vecinas. Esto podría deteriorar la selección normal o la filtración de las señales entrantes que caracterizan a la fisiología normal de los GB.

Así, la dinámica funcional de los GB cambia, inhibiendo los movimientos ayudados por la corteza mediante un creciente aumento de actividad de la red de NST-GPi y la excitabilidad reducida en la vía directa (Rubchinsky et al., 2003; Leblois et al., 2006). Dentro de las características típicas en la EP se incluye también la alteración de los movimientos automáticos con signo de Meyerson positivo, la disminución en la oscilación de los brazos y la disminución de la longitud de los pasos durante la marcha. Estos signos son mediados probablemente por alteraciones en el tallo cerebral, el cual también se encuentra funcionalmente deteriorado por el aumento de las salidas inhibitorias de los GB. Esto se ha demostrado experimentalmente mediante la excitabilidad del reflejo palpebral (Basso et al., 1996).

Se cree que probablemente un mecanismo similar es la causa de la deficiencia en la realización de otros movimientos automáticos en la EP. Sin embargo, la comprensión actual de la fisiopatología de los GB no proporciona una explicación adecuada para otras características esenciales de las alteraciones motoras en la EP (Marden, 1982). Dentro de éstos se incluyen la dificultad para la realización de movimientos simultáneos y secuenciales, una reducción progresiva en la amplitud mientras se realizan movimientos repetitivos, y la llamativa mejora del congelamiento de la marcha inducida

por claves visuales. Una nueva perspectiva para entender algunos de estos problemas se ha presentado por el estudio de poblaciones neuronales como complemento a los registros unicelulares.

La variedad de circuitos que conectan a los GB de forma tanto interna como con el tálamo y el tallo cerebral, proveen amplias posibilidades para la sincronización de neuronas y oscilaciones en la red neuronal. Estudios con animales han demostrado que la falta de DA se asocia con una sincronización aumentada de la actividad neuronal a través de los GB (Bergman et al., 1994; Dejean et al., 2008).

El uso de estimulación profunda cerebral en el GPi o NST para tratar la EP, permite el registro de los potenciales del campo local de forma rutinaria. Existe un acuerdo general, que en los estados farmacológicos de apagado, el NST muestra predominantemente actividad en rango de alfa a beta (11-30Hz), el cual, se atenúa cuando los signos parkinsonianos disminuyen durante el estado de encendido farmacológico (Brown, 2003; Alonso-Frech et al., 2006). El estado de encendido se caracteriza por un pico de alrededor de 60 a 80Hz y por un aumento en la actividad theta cuando se presentan discinesias inducidas por levodopa. Los movimientos voluntarios llevan a una reducción significativa de la actividad alfa beta, empezando cerca de 1 segundo antes de la iniciación del movimiento y continuando hasta que el movimiento se termina. Esta secuencia, ocurre tanto en estado de apagado como de encendido, aunque la reducción de la actividad beta durante el estado de encendido sea menos abierta por la actividad que se encuentra reducida.

En sujetos sanos, se han encontrado cambios similares en la actividad oscilatoria en la corteza motora a las encontradas en el NST (Alegre et al., 2003). Todo lo anterior ha llevado a los investigadores a sugerir que los pacientes con EP pueden tener mayor dificultad que los individuos sanos, para reducir la actividad beta antes del movimiento, lo cual puede proveer una mejor explicación de las características acinéticas y bradicinéticas de los pacientes con EP.

El modelo actual de los GB no proporciona ninguna explicación para la rigidez y el temblor, que son las dos otras características cardinales de la EP. En relación con este último, ahora se sabe que el estado parkinsoniano es caracterizado no sólo por hiperactividad neuronal en las salidas de los GB, sino también por el aumento de la sincronización del disparo neuronal, que resulta en oscilaciones (Montgomery, 2007) que son particularmente evidentes cuando el temblor está presente. El registro de la actividad neuronal en pacientes con EP, ha mostrado una correlación entre el temblor en los miembros y el disparo rítmico de 4 a 6 Hz de los núcleos de los GB (GPe, GPi, NST), así como en el núcleo ventral intermedio del tálamo (Rodríguez et al., 1998; Ohye et al., 1993).

Tanto la lesión como la estimulación profunda cerebral del NST, del GPi, o del núcleo ventral intermedio, dan como resultado una disminución en el temblor en pacientes con EP. Sin embargo, el núcleo ventral intermedio, es un área que recibe información del cerebelo y no está conectada directamente con los GB. Estudios en cultivos organotípicos demostraron que GPe y NST, en ausencia de DA, tienen una fuerte tendencia a generar disparos rítmicos y recíprocos causando una actividad de disparo de 4 a 5 Hz (Bevan et al., 2002), por lo que resulta tentador sugerir que la compleja organización de los circuitos de los GB produce una tendencia a generar actividad oscilatoria que puede producir temblor en la EP. Sigue sin ser aclarado si los mecanismos que producen temblor son primarios y dependen de la deficiencia de DA estriatal, o son la consecuencia de la deficiencia directa de las proyecciones dopaminérgicas sobre el NST, GPe, GPi o el tálamo (Rivlin-Etzion et al., 2008). Por otra parte, un estudio reciente en monos verdes muestra que hay una baja capacidad de filtración de la corteza motora para estimular el GPi a más de 5 Hz (Rivlin-Etzion et al., 2008). Esto permitió a los autores sugerir que la actividad relacionada con el temblor de 4 a 6 Hz que se observa en la EP, no es realmente la que conduce al sistema motor, sino que el temblor en la EP se origina fuera de los GB, por ejemplo, en núcleos motores del tallo cerebral o de la médula espinal.

No se comprende en su totalidad cómo es que la falta de DA genera una actividad oscilatoria anormal en una extensa red neuronal motora que involucra los GB, cerebelo, tálamo y la corteza motora. Del mismo modo, no se sabe por qué algunos pacientes con EP manifiestan temblor y otros no, y porque las lesiones en el núcleo ventral intermedio mejoran el temblor pero no la rigidez y la bradicinesia, mientras que todas estas manifestaciones mejoran con la lesión del NST o del GPi (Obeso et al., 2008).

La rigidez es esencialmente un aumento en la resistencia al movimiento pasivo. Se ha pensado por décadas que la rigidez se relaciona con un aumento en la excitabilidad del reflejo del estiramiento. El reflejo de estiramiento tónico, así como el fásico están facilitados en pacientes con EP (Andrews et al., 1972; Rothwell et al., 1983). No se ha explorado realmente como es que los cambios en los GB asociados con el agotamiento de DA dan lugar a la consecuente modificación de la excitabilidad de los mecanismos de los reflejos de estiramiento. Es bien sabido que la cirugía de los GB como la palidotomía, subtalamotomía, y estimulación profunda cerebral tanto del GPi o el NST, así como la talamotomía que involucre el núcleo anteroventral (el cual recibe proyecciones palidales) tienen un efecto importante para mejorar la rigidez. Sin embargo, el mecanismo exacto responsable de este efecto no se conoce. Un punto interesante es que la excitabilidad de la corteza motora primaria está aumentada en el estado parkinsoniano (Reis et al., 2008), a diferencia de las áreas premotoras y

prefrontales, que son hipoactivas, y es posible que las proyecciones hacia el NST del área 4 puedan haber aumentado el reflejo. Ésto permitiría impulsos aferentes de los músculos y articulaciones durante el movimiento para excitar la vía directa cuya actividad está aumentada. En armonía con este concepto, las neuronas de NST y de GPi responden al estiramiento y la vibración del músculo (que activa selectivamente las fibras aferentes 1a) en el modelo de monos con MPTP y pacientes con EP. Sin embargo, un aumento tal, en la respuesta del GPi para dar como resultado la facilitación del reflejo de estiramiento no es probable (Obeso et al., 2008).

En la fase presintomática de la EP, las consecuencias funcionales de una lenta y progresiva disminución de la DA estriatal se compensa mediante cambios en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales restantes, así como mediante ajustes en los GB y en los circuitos corticales que mantienen la actividad del circuito motor en límites normales a pesar de la neurodegeneración progresiva (Bezard et al., 2003).

Eventualmente, el equilibrio se pierde y los signos cardinales de la EP emergen. Sin embargo, los mecanismos compensatorios permanecen activos, esto explica que las manifestaciones clínicas sean sutiles en los primeros estadios de la enfermedad, por ejemplo, que los signos se presentan exclusivamente de un solo lado, a pesar del extenso agotamiento bilateral de DA en el estriado.

Así, en el estado parkinsoniano, los GB no se encuentran funcionando de manera normal, pero la red neuronal continúa siendo capaz de funcionar de forma relativamente estable. Esta característica esencial del funcionamiento de los GB, así como la compensación de los mismos, es alterada por la terapia farmacológica habitual con levodopa (Obeso et al., 2004).

La neurodegeneración progresiva y la pérdida de las fibras nigroestriatales da como resultado la incapacidad de mantener la estimulación tónica del receptor de DA, lo cual es el mecanismo básico para la regulación de la excitabilidad neuronal en el estriado (Grace, 2008). Dosis habituales intermitentes de levodopa provocan oscilaciones en la concentración plasmática del fármaco, lo que se traduce en fluctuaciones patológicas de los niveles de DA en el estriado y por lo tanto en activaciones intermitentes del receptor de DA.

Fisiológicamente, esas pulsaciones discontinuas o estimulación pulsátil de los receptores dopaminérgicos en el estriado, se traduce en un patrón de disparo anormal en las neuronas aferentes de los GB, lo que da lugar a alteraciones motoras. Así, la administración de apomorfina o levodopa en bolo, puede reducir el aumento en la tasa de disparo de las neuronas del GPi que caracterizan el estado de apagado y mejoran la función motora en los pacientes con EP, pero no se normalizan las salidas de los GB (Obeso et al., 2000). El estado de prendido aún se asocia con hipoactividad del NST y

del GPi, de modo que la tasa de disparo del GPe/GPi (aproximadamente de 1) está marcadamente aumentada (Heimer et al., 2002), además existen importantes modificaciones al permanecer la actividad oscilatoria, lo cual conduce a una reducción en la actividad beta y a un incremento en actividad theta lo que provoca discinesias (Brown, 2003; Alonso-Frech, 2006). Del mismo modo, la levodopa reduce, pero no normaliza, el porcentaje de correlación entre pares de neuronas con disparos sincrónicos en el GPi y el GPe en monos con MPTP (Heimer et al., 2002). Así, las dosis intermitentes de levodopa no normalizan la fisiología de los GB y pueden de hecho, actuar como un desestabilizador.

Se cree que ésta estimulación dopaminérgica intermitente induce una estimulación pulsátil anormal de los receptores dopaminérgicos estriatales dando como resultado una falta de regulación de las señales intracelulares y cambios plásticos en las neuronas espinosas medianas que se asocian con complicaciones motoras en particular con discinesias (Olanow et al., 2006).

Este concepto sugiere que la administración más continua de levodopa, como ocurren en condiciones fisiológicas normales, podría reducir el riesgo de inducir complicaciones motoras (Olanow et al., 2006). De hecho, en pacientes con EP avanzada, la infusión de levodopa se asocia con una reducción significativa tanto del tiempo en estado de apagado, como de discinesias, esto en comparación con las dosis intermitentes de levodopa normalmente usadas (Stocchi et al., 2005).

Tratamiento

Sintomático

El tratamiento sintomático se inicia usualmente cuando los síntomas se presentan, resultan molestos o causan problemas para desarrollar la vida cotidiana. En pacientes jóvenes en los que el temblor es el síntoma principal se pueden usar anticolinérgicos. Los efectos secundarios como sedación, confusión mental, estreñimiento y retención urinaria de éste tipo de medicamentos limitan su uso en pacientes mayores.

La amantadina, que es un medicamento antiviral, tiene efectos antiparkinsónicos débiles, se puede usar como terapia inicial. Sin embargo, un tratamiento más definitivo en los inicios de la EP puede llevarse a cabo mediante agonistas dopaminérgicos o levodopa.

Los agonistas dopaminérgicos usados en monoterapia raramente causan discinesias (Parkinson Study Group, 2000; Rascol et al., 2000), por este motivo generalmente el tratamiento de pacientes jóvenes y sin otras enfermedades, se inicia con agonistas dopaminérgicos. Los agonistas tienen menos efectos antiparkinsónicos que la levodopa, pero usualmente es suficiente para controlar los síntomas en los primeros

años. Por otra parte, este tipo de fármacos generan fuertes efectos adversos en personas mayores, por lo que se sugiere la levodopa como terapia inicial, además de ser un fármaco más barato que los agonistas (Samii et al., 2004).

Los efectos adversos más comunes de los agonistas dopaminérgicos incluyen náusea, hipotensión, edema en miembros pélvicos, sueños vívidos, alucinaciones (especialmente en personas mayores con alteraciones cognitivas), somnolencia y ataques súbitos de sueño (Etminan et al., 2001; Etminan et al., 2003; Homann et al., 2003). La náusea puede tratarse con domperidona, que es un antagonista dopaminérgico que no cruza la barrera hematoencefálica y no empeora el parkinsonismo. Si no se tolera un agonista dopaminérgico, se debe cambiar por otro, ya que existen diferencias en la susceptibilidad a los efectos adversos (Etminan et al., 2003).

La levodopa sigue siendo el agente antiparkinsoniano más potente y es el tratamiento que generalmente se usa a lo largo de todo el curso de la enfermedad. La mayoría de los pacientes inician con agonistas dopaminérgicos pero suelen necesitar que se agregue levodopa dentro de los primeros 5 años (Rascol et al., 2000). La levodopa en combinación con carbidopa o benserazida se usa para evitar la conversión sistémica a DA por la L-dopa descarboxilasa o descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (DAA). Los efectos adversos de la levodopa son similares a los de los agonistas dopaminérgicos, excepto por la somnolencia, las alucinaciones y edemas de los miembros pélvicos, que son menos comunes, además si se combina con carbidopa o domperidona, puede reducir algunos efectos como la náusea (Samii et al., 2004).

Las principales complicaciones del tratamiento con levodopa a largo plazo son las fluctuaciones motoras. Inicialmente, los pacientes notan que el efecto del fármaco disminuye o se apaga y se vuelven más lentos y temblorosos. Con el tiempo, los individuos pueden tener fluctuaciones que van de periodos de movilidad a inmovilidad completa. Al principio, las fluctuaciones se pueden predecir, a esto se le llama, periodo de apagado de final de dosis. Con el tiempo, las fluctuaciones se pueden volver impredecibles con súbitos cambios entre movilidad e inmovilidad, a esto se le llama efecto de encendido y apagado (Nutt, 2001). Entre un cuarto y la mitad de los pacientes desarrollan fluctuaciones después de los primeros 5 años (Hely et al., 1994; Koller et al., 1999), mientras que estas fluctuaciones en pacientes de inicio temprano de la EP, pueden subir hasta un 90% en 5 años (Schrag et al., 1998).

Las discinesias surgen después de meses o años del tratamiento crónico con levodopa y pueden tener diversos patrones (Luquin et al., 1992). La corea en el pico de la dosis es la forma más común, pero la distonía puede ocurrir también, sola o en combinación con corea. Las discinesias difásicas se refieren a las que se presentan al principio y al

final de la dosis. El paciente puede desarrollar distonía dolorosa al final de la dosis, a esto se le llama distonía de estado de apagado.

La principal causa de las fluctuaciones motoras es la vida media corta de la levodopa (90-120 min). El tratamiento para estas fluctuaciones se enfoca en mejorar la absorción, cambiando el tiempo de las dosis, y prolongando el efecto de cada dosis. Las comidas altas en proteínas pueden reducir la absorción de la levodopa y limita su habilidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Nutt et al., 1984). Separar la ingesta de proteínas a lo largo del día puede ayudar a reducir las fluctuaciones motoras. Prolongar los efectos de cada dosis de levodopa se puede alcanzar controlando las formas de liberación, pero a expensas de hacer la absorción algo más impredecible.

Los inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) como el entacapone o el tolcapone alivian los estados de apagado del final de la dosis alargando la vida media de la levodopa circulante (Thase, 1998). El tolcapone es el inhibidor más potente, pero ha causado algunos casos de falla hepática fatal por lo que está prohibido en algunos países (Assal et al., 1998). Los agonistas dopaminérgicos aumentan la efectividad de la levodopa y ayudan a reducir el tiempo de apagado (Goetz, 2003).

Las discinesias están relacionadas con el uso de levodopa y pueden exacerbarse por cualquier estrategia usada para tratar las fluctuaciones motoras mediante el aumento del efecto del fármaco. La incapacidad puede disminuirse reduciendo la dosis de levodopa, pero esto generalmente genera un descontrol del parkinsonismo; esta situación se puede mejorar agregando algún agonista dopaminérgico. La amantadina puede servir como un supresor de discinesias (Verhagen et al., 1998) probablemente a través del agonismo sobre el receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA); (Greenamyre y O'Brien, 1991).

Quirúrgico

La ablación de estructuras profundas cerebrales para tratar la EP comenzó hace seis décadas (Guridi y Lozano, 1997). Antes del advenimiento de la levodopa, la talamotomía reducía exitosamente el temblor contralateral (Burchiel, 1995), la palidotomía mejoraba en algunos casos la sintomatología de la enfermedad (Guridi y Lozano, 1997). La cirugía funcional fue virtualmente abandonada con la introducción de la levodopa al final de la década de 1960. Sin embargo, las complicaciones de las fluctuaciones motoras, y la presencia de discinesias con el tratamiento a largo plazo, han resultado en un resurgimiento del tratamiento quirúrgico (Laitinen et al., 1992).

La palidotomía unilateral mejora de manera importante el temblor y las discinesias contralaterales (Samii et al., 1999). La palidotomía bilateral se asocia con alteraciones

importantes como disfagia, abulia, afonía y deficiencias cognitivas por lo que no se recomienda (Ghika et al., 1999).

La estimulación cerebral profunda de alta frecuencia, trata de obtener los mismos resultados que la cirugía ablativa, mediante la reducción de la actividad neural del tejido que rodea al electrodo. Sin embargo, la estimulación profunda es menos invasiva, es reversible y provoca menor traumatismo en el cerebro que la cirugía ablativa. Además la lesión funcional inducida por la estimulación de alta frecuencia es susceptible de ajustes mediante la configuración del electrodo, intensidad del estímulo, amplitud del pulso, y frecuencia. Por lo tanto, la estimulación profunda cerebral bilateral, ha sustituido a la palidotomía unilateral como el procedimiento de elección para la EP (Lozano, 2003). Sin embargo aun existen los casos donde la talamotomía o la palidotomía pueden ser procedimientos adecuados para pacientes bien seleccionados. Los efectos adversos de cualquier cirugía incluyen hemorragia cerebral, infartos, convulsiones y puede llegar a ser fatal (Beric et al., 2001).

La estimulación unilateral del tálamo, como la talamotomía, resuelve el temblor contralateral, pero no resuelve otros síntomas propios de la EP (Schuurman et al., 2000). La estimulación bilateral del globo pálido o del NST es mucho más efectiva para mejorar los síntomas motores que la estimulación del tálamo. La estimulación bilateral del globo pálido mejora la rigidez y el temblor en los estados farmacológicos de apagado y discinesias (Volkman et al., 1998). La estimulación bilateral del NST mejora la rigidez y bradicinesia, sobre todo en los estados farmacológicos de apagado (Moro et al., 1999). La clave del éxito de la neurocirugía funcional es la correcta selección de los pacientes, por lo que los criterios de inclusión y exclusión deben ser muy estrictos (Lozano, 2003).

1.2 Dopamina

Biosíntesis de dopamina

La DA es el precursor metabólico inmediato de la noradrenalina y adrenalina, sintetizada a partir de L-tirosina que, por acción de la enzima TH es hidroxilada para convertirse en hidroxil-L-fenilalanina (L-dopa), que posteriormente es descaboxilada por la L-dopa-descarboxilasa para dar DA. La TH es una enzima soluble compuesta de 4 subunidades de aproximadamente 60 KDa c/u. Se encuentra en todas las células que sintetizan catecolaminas y es el enzima limitante de sus rutas biosintéticas. La TH es una oxidasa de acción combinada que usa el oxígeno molecular y la tirosina como sustratos y la tetrahidrobiopteridina (BH4) como cofactor. Cataliza la adición de un grupo hidroxilo a la meta posición de la tirosina, formando de esta manera la L-dopa. La actividad de TH está controlada principalmente por inhibición de productos finales,

por ejemplo, una alta concentración citoplasmática de DA inhibe la actividad de TH y la disminución de la actividad neuronal de los niveles de DA reactivan la TH.

Almacenamiento, liberación y recaptura de dopamina

Una vez que es sintetizada la DA en el citoplasma, es incorporada a las vesículas sinápticas a través de la acción de los transportadores de monoaminas vesiculares de tipo 2 (VMAT2), los cuales concentran DA dentro de las vesículas a través de una bomba ATP-protón dependiente, que además de generar un gradiente ácido, produce a la forma activa de DA (DA⁺). En dichas vesículas se alcanzan concentraciones de 500 mM aproximadamente. La liberación de DA de las vesículas sinápticas es un proceso mediado por la acción de canales de calcio sensibles a voltaje, el cual promueve la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana neuronal que resulta en la liberación de DA⁺ al espacio sináptico. Después de la acción de la DA sobre el receptor postsináptico, el neurotransmisor es recapturado por transportadores de DA (DAT), una proteína que está presente en la membrana plasmática de neuronas dopaminérgicas en forma de dímero. Este transportador es dependiente de sodio y cloro. La recaptura es inhibida por antidepresivos tricíclicos y cocaína pero no por reserpina.

Degradación de dopamina

La biodegradación de la DA se efectúa por dos vías diferentes: a nivel neurocitoplasmático, experimenta desaminación oxidativa y es convertida en ácido 3,4-dihidroxiifenilacético (DOPAC) por la monoamina-oxidasa (MAO) localizada en la membrana externa mitocondrial. Y a nivel extracelular, la DA que no se encuentra unida a los receptores es metilada y convertida en O-metil-dopamina por la Catecol-O-metiltransferasa (COMT). Los 2 productos de la degradación sufren transformación enzimática mediante la MAO para dar origen al metabolito inactivo más importante de la DA, el ácido homovanílico (AHV) (Santiago-López y Rivas-Arancibia, 2008).

1.3 Modelo de MPTP en primates no humanos

El 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) fue introducido a la comunidad de investigación sobre la EP cuando fue encontrado en lotes de un análogo de heroína sintética, la cual fue autoadministrada por adictos a las drogas. Estos individuos desarrollaron un síndrome agudo con todos los signos cardinales de la EP, incluidos bradicinesia, acinesia, rigidez muscular, y en diferentes grados temblor en reposo (Langston et al., 1983; Ballard et al., 1985). Este desafortunado incidente dio como resultado la introducción de un nuevo modelo de EP en primates no humanos (Burns et

al., 1983; Langston et al., 1984). Los monos tratados con el MPTP desarrollaron la mayoría de los síntomas cardinales de la EP, en especial, los relacionados con acinesia y rigidez (Burns et al., 1983; Doudet et al., 1985; Shultz et al., 1985, 1989a, 1989b), e incluso los cognitivos (Fernández-Ruiz et al., 1999). El temblor en reposo de baja frecuencia (4-8 Hz) no es fácilmente replicable en macacos tratados con MPTP (Jenner et al., 1986; Benazzouz et al., 1992; Wilms et al., 1999) pero algunas especies, como el mono verde africano o mono vervet pueden desarrollar un prominente temblor de baja frecuencia (4-7 Hz) tanto de acción como en reposo (Bergman et al., 1994; Raz et al., 2000).

En estudios postmortem, los cerebros de los monos tratados con MPTP muestran que la principal alteración es en el sistema dopaminérgico. Estudios de inmunorreactividad para TH, (la enzima limitante en la biosíntesis de DA), revelan una pérdida de neuronas positivas a TH en la vía nigroestriatal (Elsworth et al., 2000; Song y Haber, 2000; Bezard et al., 2001). Además de lo anterior, en pacientes con EP, otros neuromoduladores se encuentran afectados también (Piffl et al., 1991).

La extensión del daño neuronal y la severidad que resultan en la manifestación de síntomas parkinsonianos, depende fuertemente del protocolo de administración del mismo. El protocolo más común consiste en la aplicación sistémica intramuscular del MPTP. Dependiendo de la dosis total, el número y la frecuencia de las inyecciones, los primates pueden desarrollar tanto el espectro de respuestas de un parkinsonismo severo (Chiueh et al., 1985) como un cuadro clínico medio dominado por alteraciones cognitivas frontales pero sin signos motores (Schneider y Kovelowski, 1990; Schneider., 1990; Roeltgen y Schneider, 1994; Schneider y Pope Coleman, 1995; Slovin et al., 1999). En contraste con la patología humana (Kish et al., 1988), el tratamiento agudo con MPTP produce una depleción de DA que se equipara o es más severa en el núcleo caudado que en el putamen (Piffl et al., 1988).

La exposición a dosis bajas administradas crónicamente, se ha sugerido como un modelo más fiable de la lenta y progresiva enfermedad en humanos (Schneider, 1990; Hantraye et al., 1993; Pérez Otano et al., 1994). Animales tratados crónicamente con dosis bajas de MPTP muestran una disminución importante de DA en la porción dorsolateral (putaminal) del estriado. En estos animales se pueden observar deficiencias cognitivas frontales, movimientos oculares anormales que aparecen incluso antes de que se puedan observar alteraciones motoras (Schneider y Kovelowski, 1990; Schneider y Roeltgen, 1993; Slovin et al., 1999). Ésto es congruente con las últimas deficiencias cognitivas encontradas en humanos con MPTP (Stern y Langston, 1985; Stern et al., 1990) y en pacientes con EP (Brown y Marsden, 1990).

Otros métodos experimentales incluyen la administración de MPTP mediante inyección carotídea (Bankiewicz et al., 1986; Eberling et al., 1998). Este método es muy útil ya que produce hemiparinsonismo, permitiendo un control más simple de la salud del animal así como de su alimentación. Sin embargo, debido a sus efectos unilaterales, la interacción compensatoria entre ambos hemisferios y la naturaleza bilateral (aunque no simétrica) de la enfermedad en humanos, se considera usualmente como un modelo inferior a los que se obtienen de forma sistémica.

El MPTP atraviesa libremente la barrera hematoencefálica. Una vez en el cerebro, éste entra en los astrocitos donde, en un principio, es metabolizado por la enzima monoamina-oxidasa-B (MAO-B) a 1-metil-4-fenil-1,2,3-dihidropiridinium (MPDP+) que después se transforma en su protoxina 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP+) (Ransom et al., 1987), que es la sustancia tóxica. Ya que el MPP+ es una molécula polar, no puede salir libremente del astrocito, por esto se ha sugerido que debe existir un transportador específico que activamente mueva la molécula fuera de la glía (Inazu et al., 2003; Russ et al., 1996), sin embargo el mecanismo exacto no se conoce aún. Una vez que el MPP+ es liberado al medio extracelular, es selectivamente capturado por células dopaminérgicas mediante el DAT. El MPP+ puede ser secuestrado en vesículas citoplasmáticas por acción del transportador vesicular de monoaminas o puede entrar a la mitocondria por difusión mediada por gradiente eléctrico. Una vez dentro de la mitocondria el MPP+ inhibe la respiración celular mediante el bloqueo de la enzima transportadora de electrones NADH:ubiquinon oxidorreductasa (Complejo I) (Nicklas et al., 1985; Suzuki et al., 1990). Otros estudios han demostrado que el MPP+ no solo inhibe el complejo I, sino, también los complejos III (ubiquinol:ferrocitocromo c oxidorreductasa) y IV (ferrocitocromo c:oxígeno oxidorreductasa o citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria (Mizuno et al., 1988). La pérdida de la energía celular por cualquiera de estas vías conlleva varias consecuencias, incluyendo la generación de radicales libres de oxígeno, superóxido e hidroxilo, lo cual aunado a la falta de energía puede generar la muerte de las células dopaminérgicas (Smeyne y Jackson-Lewis, 2005).

1.4 Evaluación de Modelos animales de enfermedad de Parkinson

Para la evaluación de modelos animales de la EP, así como sus posibles mejorías con los tratamientos, se han desarrollado una serie de métodos y técnicas que dependen del modelo con el que se esté trabajando. A continuación presento una revisión de los métodos más comunes utilizados en los modelos de ratones con MPTP, ratas con 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), y con primates no humanos con MPTP.

Artículo 1

***Evaluación de alteraciones motoras en modelos animales de enfermedad de
Parkinson***

(Rev Neurol. 2008; 46 (3): 167-174)

Evaluación de alteraciones motoras en modelos animales de enfermedad de Parkinson

A. Campos-Romo

EVALUACIÓN DE ALTERACIONES MOTORAS EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Resumen. Introducción. El diagnóstico de la enfermedad de Parkinson es básicamente clínico, es decir, se basa en la observación de las alteraciones motoras de los pacientes, por este motivo se considera sencillo; sin embargo, sólo un 75% de los diagnósticos realizados clínicamente se confirma en la autopsia. Los modelos animales generados mediante la aplicación sistémica o intracerebral de neurotoxinas como 6-hidroxidopamina (6-OHDA) para ratas o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) para ratones y primates no humanos, induce un daño en el sistema dopaminérgico nigroestriatal. Esto da como resultado una variedad de síntomas motores como acinesia, bradicinesia, rigidez, temblor, alteraciones en la marcha y posturas anormales; por este motivo es un reto evaluar los cambios de los signos parkinsonianos en los modelos animales. Desarrollo. Se revisa la variedad de paradigmas para valorar estos síntomas en los modelos de ratones, ratas y primates no humanos, los cuales se han utilizado para medir las diferencias que se generan con la aplicación de las neurotoxinas y, en algunos casos, las mejorías de los diferentes tratamientos para los síndromes parkinsonianos inducidos. Conclusiones. Se comentan los resultados generales de estos trabajos y se discuten los factores que influyen en las pruebas, y los potenciales problemas y beneficios que pueden tener los procedimientos experimentales. [REV NEUROL 2008; 46: 167-74]

Palabras clave. Evaluación motora. Modelos animales. MPTP. 6-OHDA. Parkinsonismo. Primates. Roedores.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) idiopática fue descrita por James Parkinson en 1817; es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes, que afecta aproximadamente al 1% de la población por encima de los 50 años de edad [1]. Está causada por una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (*pars compacta*), y da como resultado una pérdida de la vía nigroestriatal y, por consiguiente, una disminución de dopamina en el estriado. Su etiología exacta no se conoce, sin embargo se ha descrito que tanto factores genéticos como ambientales pueden estar implicados. [2,3]. Clínicamente se caracteriza por signos cardinales como temblor, rigidez de tipo de rueda dentada, bradicinesia e inestabilidad postural y del equilibrio [4]. Con el fin de reproducir esta enfermedad para su estudio, se han desarrollado modelos animales, la mayoría de los cuales se basan en la degeneración de la vía nigroestriatal, que han dado como resultado un síndrome parkinsoniano clínicamente similar a la enfermedad idiopática. El objetivo de este trabajo es revisar la variedad de paradigmas que se utilizan para evaluar estos síntomas en los modelos de parkinsonismo en ratones, ratas y primates no humanos.

MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Para el estudio de la EP ha sido necesaria la creación de modelos animales que reproduzcan dicha enfermedad, tanto los sín-

tomos clínicos como los cambios histológicos y neuroquímicos. Al tratarse de modelos, no es posible reproducir de manera exacta todas las alteraciones, sin embargo permiten obtener información importante de la dinámica funcional de las estructuras afectadas (principalmente los ganglios basales), así como del efecto de posibles tratamientos para la enfermedad. Los modelos más utilizados son los que se generan mediante la administración de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas [5] y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) para ratones [6] y primates no humanos [7]. La administración de estas toxinas resulta en la manifestación de síntomas motores similares a los que se presentan en la EP, como acinesia, bradicinesia, rigidez, temblor, alteraciones en la marcha y posturas anormales. Es importante recalcar que el grado de sintomatología parkinsoniana inducida por MPTP va a depender de la susceptibilidad del sujeto; por ejemplo, en el modelo de ratones, las cepas C57 y BL6 son las más susceptibles, del mismo modo que en el modelo de primates no todas las especies van a tener la misma susceptibilidad, incluso sujetos de la misma especie pueden necesitar dosis diferentes para manifestar signos extrapiramidales claros.

EVALUACIÓN DE ALTERACIONES MOTORAS

El cuadro clínico de la EP idiopática consta prácticamente de alteraciones motoras, por lo que el diagnóstico es fundamentalmente clínico; para ello, se han desarrollado escalas como la *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS), que es la más utilizada, para valorar signos extrapiramidales como marcha, temblor, bradicinesia, acinesia, rigidez, postura, etc. Estas escalas permiten categorizar los grados de parkinsonismo, la respuesta al tratamiento y la evolución de la enfermedad. Por otro lado, las investigaciones con modelos animales se han enfrentado a una situación similar, en la que deben diseñarse tanto escalas que valoren el desempeño motor de los sujetos como tareas que sean capaces de categorizar los grados de parkinsonismo y la respuesta a las diferentes aproximaciones terapéuticas.

Aceptado tras revisión externa: 21.01.08.

Laboratorio de Neuropsicología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF, México.

Correspondencia: Dr. Aurelio Campos Romo. Laboratorio de Neuropsicología. Departamento de Fisiología. Edificio de Investigación, piso 5. Facultad de Medicina. UNAM. Circuito Escolar, s/n. Ciudad Universitaria. Copilco, Coyoacán. 04510 México DF, México. Fax: (55) 56232241. E-mail: aure_77@yahoo.com

© 2008, REVISTA DE NEUROLOGÍA

EVALUACIÓN DE MODELOS EN ROEDORES CON MPTP Y CON 6-OHDA

Es posible observar cambios conductuales agudos justo tras la administración de MPTP en ratones e incluso algunas horas después, como puede ser una posición anormal de la cola (arqueada y dura) [8-10], piloerección [8-10], sialorrea [9,10], taquipnea [10], hipotonía muscular [11] o hiperreactividad a estímulos externos [9]; estos síntomas pueden aparecer minutos después de la administración de MPTP y desaparecer horas después.

Evaluación de actividad

Prueba de acinesia y catalepsia

Para la prueba de acinesia, que es la falta de movimiento, se coloca el animal en una superficie plana y se cuenta el tiempo hasta que el animal haya movido los cuatro miembros. La catalepsia, que es la inhabilidad del animal para corregir una postura impuesta externamente [12], se puede cuantificar colocando los miembros torácicos o pélvicos sobre un pequeño bloque o barra colocados a unos centímetros del suelo y se determina el tiempo que tarda el animal cataléptico en corregir la posición anormal, lo que se produce de forma instantánea en animales sanos. También es posible hacerlo mediante el uso de una rejilla en la cual los animales son gentilmente colgados con las patas agarradas de la rejilla que se encuentra en forma vertical. En estas pruebas se mide el tiempo que le toma desplazar activamente una de las patas, y ese tiempo se valora como el grado de catalepsia [13].

Se ha observado que existe un aumento importante en la latencia de acinesia con una disminución de dopamina estriatal del 40% en 3,5 y 7 horas después del tratamiento [14], y un aumento de la latencia de catalepsia después de 3,5 horas [15].

Esta prueba puede emplearse para evaluar tanto ratas tratadas con 6-OHDA [13] como ratones tratados con MPTP [14,15]. Es técnicamente sencilla de realizar y de bajo coste.

Prueba de acinesia de los miembros delanteros

La acinesia, o incapacidad para moverse o hacerlo con mucha dificultad, puede ser evaluada en los miembros delanteros. Para esta prueba debe usarse un modelo de lesión unilateral, para lo cual se prefiere el de rata lesionada unilateralmente con 6-OHDA. Para la prueba, se graba en vídeo a los animales mientras producen movimientos de marcha [16]. Los miembros traseros y uno de los delanteros están detenidos por el investigador para poder evaluar el miembro delantero libre, el cual tiene que estar en contacto con una superficie horizontal.

Usualmente, para producir los movimientos de pasos, el investigador mueve al animal en sentido lateral y cuenta el número de pasos por segundo.

Poulton et al [17] modificaron este sistema y utilizaron una rueda giratoria para producir los pasos; además utilizaron una correa para generar tres diferentes posiciones del miembro libre: abducción, aducción y extensión. La rueda se colocó a velocidad constante y se grabaron en vídeo las ejecuciones de la tarea.

En las cintas se evalúa el número de pasos por segundo para cada miembro y se calcula de la siguiente manera: [pasos ipsolaterales / (ipsolaterales + contralaterales)] - [pasos contralaterales / (ipsolaterales + contralaterales)], donde una calificación de cero indica una simetría perfecta. En dicho estudio observaron que en las tres diferentes pruebas los animales mostraron una asimetría, siendo el miembro contralateral a la lesión el que mostró mayores deficiencias, es decir, mayor lentitud para iniciar los movimientos.

Esta prueba es útil para valorar el modelo de lesión unilateral, ya que permite comparar el movimiento del miembro ipsilateral con el del miembro contralateral a la lesión cerebral.

Campo abierto (open field)

La prueba de campo abierto es la que comúnmente se utiliza como método para medir la cantidad de actividad del sujeto después de la administración tanto de MPTP en el modelo de ratón como de 6-OHDA en el modelo de rata. En la mayoría de los estudios la actividad del animal se ha observado mediante la evaluación de destellos infrarrojos desde el campo abierto. El patrón de los destellos es procesado después mediante un *software* para obtener parámetros como el tiempo que se pasó en movimiento o la distancia caminada. Numerosos estudios se han evaluado mediante este método, y en la mayoría se observa una disminución tanto de la locomoción como de la actividad en general después del tratamiento con las neurotoxinas. Esto indica que los sujetos expuestos a éstas presentan hipocinesia. Esta hipoactividad se observa en ratones tratados con MPTP desde los primeros 30 minutos después del tratamiento [18], y en algunos casos ha durado hasta 40 semanas [19]. Este método es capaz de medir la actividad de los sujetos en un campo abierto; sin embargo, Sundström et al [20] describieron que sutiles diferencias en el protocolo de prueba o el mismo ambiente pueden tener una gran influencia en el resultado de la conducta del animal, por lo que es fundamental ser muy cuidadosos en el manejo de los animales (p. ej., tomar en cuenta el estrés que sufren con el transporte) o el momento en que se lleva a cabo la evaluación, ya que las pruebas no tienen el mismo resultado si se llevan a cabo durante el ciclo de luz o de oscuridad. Esta prueba es sencilla de realizar, sin embargo es necesario disponer del sistema de medición por infrarrojo para contar con mediciones precisas pues, aunque es posible medir el tiempo que el sujeto está en movimiento mediante observación directa usando un cronómetro, se pierde información del tipo distancia recorrida; además, requiere de un mayor esfuerzo por parte del investigador y es posible perder precisión.

Prueba de nado

En algunos estudios se ha aplicado la prueba de nado para evaluar las deficiencias motoras de ratones parkinsonianos, los cuales se colocan en un tanque de agua y se valora el tiempo de nado activo contra flotación pasiva. Cuando los sujetos son tratados con MPTP, tienden a aumentar el tiempo que pasan flotando. En dos estudios realizados por Mohanakumar et al [15,21], se evaluó a los ratones siete días después del tratamiento y se encontró que pasaban más tiempo flotando que en nado activo. En este método es importante valorar la gravedad de la acinesia, ya que animales muy deteriorados pueden ahogarse. Por otra parte, la temperatura del agua debe controlarse estrictamente, ya que bajas temperaturas pueden desencadenar efectos de estrés en los animales, alterando su desempeño motor. Para la realización de esta prueba no es necesario contar con aparatos sofisticados, lo cual la hace económicamente accesible; sin embargo, es necesario que el investigador esté pendiente del tiempo que el sujeto se encuentre en nado activo, así como en flotación pasiva, además de mantener estrictamente las condiciones del agua.

Prueba de poste (pole test)

Esta prueba evalúa la bradicinesia y consiste en un poste de aproximadamente 50 cm de alto y 1 cm de diámetro, cubierto de gasa y con una pequeña bola de corcho en la punta. Los anima-

les se colocan con la cabeza hacia arriba justo por debajo de la punta. Se han usado dos parámetros: el tiempo transcurrido mientras el animal gira 180° sobre el poste y el tiempo que le cuesta bajar hasta el suelo tras haber girado. Los animales control realizan la prueba de forma rápida, es decir, giran y bajan rápidamente (en torno a 20 s). Por otro lado, los ratones tratados con MPTP tardan mayor tiempo en realizar la tarea [22,23]; este tiempo se reduce si se les administra levodopa [24,25]. Esta prueba es útil por su facilidad técnica y accesibilidad económica; además, se ha probado en diferentes especies con resultados similares, con excepción de la especie BALB/c, en la que no se encontró una tendencia clara para bajar el poste [20]. Por otra parte, es necesario ser muy cuidadosos con las condiciones ambientales para el éxito de la prueba, ya que alteraciones en la iluminación u otros factores pueden alterar los resultados de aquélla.

Evaluación del temblor

En varios trabajos se ha mencionado la presencia de un temblor fásico de todo el cuerpo como consecuencia aguda de la administración de MPTP [14]. Sin embargo, solamente se ha cuantificado este síntoma en algunos de ellos. Para realizar esta medición se emplean escalas basadas en una evaluación visual. Se ha observado una mayor calificación en sujetos con MPTP que en los controles tratados con solución salina después de un reto mediante la aplicación de oxotremorina [26]. En otro trabajo se evaluó el temblor mediante un monitor de temblor comercial, el cual consiste en una plataforma sensible y un analizador de frecuencia; los autores demostraron que el temblor tiene una frecuencia mayor a la de otros movimientos anormales. Usando este criterio, cuantificaron el número de eventos de temblor en 30 minutos de observación. Los resultados fueron un aumento del temblor hasta siete días después del tratamiento de ratones con MPTP.

Otro método para medir el temblor es el uso de un campo de radiofrecuencia en una caja de observación, que cambia en cuanto el animal se mueve, y posteriormente esa información es procesada mediante un análisis de espectros de energía. Este tipo de pruebas no se utilizan mucho, ya que para poder hacer la evaluación visual es necesario tener experiencia y siempre resulta subjetivo; por otro lado, si se prefieren los métodos instrumentados es necesario contar con los aparatos para medir de manera objetiva el temblor; sin embargo, esto hace la prueba más cara, pero reduce el trabajo del investigador.

Evaluación de la rigidez

La rigidez es un síntoma poco comunicado en estos modelos animales; aunque se ha mencionado en algunos trabajos la presencia de la rigidez [27,28], no es un dato que se haya utilizado para evaluar a estos animales. Existe una escala de rigidez para ratas [29] que podría ajustarse también para ratones.

Evaluación del movimiento y postura

Pruebas para alteraciones en la marcha

Los ratones pueden presentar alteraciones en la marcha (*ataxic lurching*) [30,31]. La forma que existe para evaluar la marcha es mediante el análisis de impresiones de las patas, lo cual se hace pintando las patas de los ratones y posteriormente se colocan sobre una hoja de papel y se les hace caminar. Se realiza un análisis de los patrones de los pasos. Este método permite cuantificar en los ratones parkinsonianos la disminución en la longitud de los pasos [32]. Se trata de un método sencillo y económico que puede ser útil para evaluar la marcha.

Agarre

Metz et al [33] desarrollaron dos pruebas de agarre para evaluar los miembros delanteros del modelo de rata con 6-OHDA. La primera es la prueba de éxito en el agarre, donde se cuentan los intentos fallidos y los intentos exitosos. Un intento se define como el movimiento del miembro anterior hacia la recompensa; los intentos fallidos son aquellos en los que el animal toca y pierde la recompensa, necesita más de un intento para lograr agarrarla o la pierde, mientras que un intento exitoso se produce cuando la rata logra agarrar la recompensa en el primer intento y se la coloca en la boca. Se cuenta el número de agarres exitosos entre el número de recompensas ofrecidas.

La segunda prueba es una escala en la que se subdivide el movimiento que realizan las ratas para realizar el agarre y la ingestión de una recompensa. Se tienen en cuenta los siguientes puntos: orientación, levantamiento del miembro, cierre de dedos, movimiento del hombro, avance, apertura de dedos, pronación, agarre, supinación I, supinación II y liberación. Para cada uno de los 11 componentes del movimiento de agarre e ingesta se le da una calificación de 0 cuando no existe ese componente, 0,5 si el movimiento está presente pero es anormal, y 1 si el movimiento es normal. En sus experimentos, los autores encontraron los siguientes resultados. Para la prueba de éxito en el agarre, las ratas lesionadas necesitaron de más intentos para obtener su recompensa y en varias ocasiones tiraban las recompensas en la caja sin comerlas. Por otro lado, en la prueba de la escala, los componentes de orientación, apertura y cierre de dedos no estuvieron afectados por la inyección de 6-OHDA; sin embargo el resto de los componentes se deterioraron significativamente después de la lesión en comparación con sus valores preoperatorios [33]. La prueba de éxito en el agarre es sencilla técnicamente, pero es necesario contar con el dispositivo para colocar al animal. Por otra parte, la prueba en la cual se subdivide el movimiento requiere de un entrenamiento en la observación de los animales, pero provee mucha información acerca de la calidad del movimiento y su consiguiente deterioro con la lesión.

Prueba de sujeción y coordinación

Para esta prueba es necesario contar con una malla metálica, en la cual los animales intactos tienen una conducta de escalada espontánea y pueden sujetarse durante largo tiempo. Para poder realizar la tarea, los animales necesitan tener cierta fuerza para sujetarse y, además, coordinación en sus movimientos. En ratones con MPTP se encontró que el tiempo que permanecen en la rejilla es menor que los ratones intactos [34]. Se trata de una prueba fácil de realizar, no resulta costosa en términos económicos y tampoco requiere de entrenamiento previo.

Rotarod

El rotarod consiste de cilindros giratorios con un diámetro de 7,3 cm divididos en compartimentos individuales; en general, estos aparatos cuentan por lo menos con cuatro líneas de cilindros. Estos aparatos suelen estar asociados a un ordenador, el cual permite al investigador ajustar la velocidad con que girarán, fundamental para poder someterlos a diferentes protocolos con cambios de velocidad; también permite recoger otros datos, como el momento exacto en que la rata cae del aparato. La prueba consiste en colocar al animal sobre el cilindro y se evalúa el tiempo que tarda en caer. Se han diseñado varios protocolos en los cuales los cilindros giran a velocidad constante; por ejemplo, Monville et al [35] probaron a las ratas lesionadas con

6-OHDA con un protocolo en el cual los cilindros giraban a diferentes velocidades secuencialmente mayores, es decir, se iniciaba a 12 rpm, seguido de 16, 19, 21, 24, 26, 28 rpm, para finalizar a 38 rpm, permaneciendo un máximo de 60 s en cada velocidad; se le daba al animal un descanso de 20 minutos entre cada prueba. Asimismo, en este estudio se utilizó otro protocolo en el cual el rotarod se iba acelerando suavemente desde una velocidad inicial de 4 rpm hasta alcanzar las 40 rpm en un período de 5 minutos. Los experimentos se iniciaron después de un período de entrenamiento, empezando con el protocolo de cambios de velocidad y siguiendo con el protocolo de aceleración. En ambas tareas, las ratas lesionadas fueron en menor medida capaces de permanecer sobre el aparato que las ratas intactas, las cuales lograron permanecer sobre los cilindros casi todo el protocolo. Este método se ha utilizado también para evaluar el desempeño de ratones con MPTP, donde se ha observado que se reduce el tiempo que los animales permanecen sobre el aparato [34]. Para la realización de esta prueba es necesario contar con el rotarod, el cual puede ser costoso en función de los parámetros que mida; del mismo modo, en función de la tecnología variará el esfuerzo necesario por parte del investigador. Sin embargo es un método muy útil para valorar la marcha de los sujetos.

Posición de la cabeza

Esta prueba consiste en la monitorización del número de ocasiones en que la rata mueve su cabeza hacia la derecha o la izquierda en un período de 180 s, divididos en tres pruebas de 60 s cada una.

Se considera desde una desviación de 10° desde el eje neutro del cuerpo y se cuentan los segundos que permanece en cada lado, al final se suman y se hace una resta del tiempo total que permaneció del lado ipsilateral a la lesión menos el tiempo total que permaneció del lado contralateral [36-38]. Las ratas lesionadas con 6-OHDA de forma unilateral mostraron una pronunciada diferencia con respecto a sus controles; el grupo con mayor grado de lesión tuvo de 75 a 80 giros de cabeza en 3 minutos, lo cual fue significativamente diferente con respecto a los grupos de lesiones moderadas y leves, en los cuales los giros fueron cerca de 30 en 3 minutos [38].

Asimetría en el uso de los miembros delanteros

Con esta prueba se valora el uso relativo que da el animal al miembro deteriorado y al no deteriorado para realizar movimientos de cambio de peso durante la exploración vertical espontánea [16]. Esta prueba se utiliza comúnmente como índice de asimetría en el uso de los miembros delanteros y se realiza mediante el conteo del número de contactos con cada miembro delantero mientras explora el interior de un cilindro vacío [39].

Cada rata se coloca en un cilindro de 46 cm de altura y 40 cm de diámetro, y se graba en vídeo desde una perspectiva ventral a través del cilindro durante 5 minutos. Las grabaciones se analizan y se cuenta el número de veces que el animal toca la pared del cilindro con el miembro derecho, con el izquierdo, o con ambos. Para hacer el balance final, se realiza el siguiente cálculo: $(\text{ipsilateral} / \text{total}) - (\text{contralateral} / \text{total}) = \text{resultado de asimetría}$. Poulton et al [17] realizaron esta evaluación y encontraron que todos los grupos lesionados mostraron una asimetría que favorecía al miembro ipsilateral a la lesión. Se trata de una prueba muy buena para valorar la asimetría en modelos unilaterales; para su realización es necesario lesionar quirúrgicamente a la rata de un solo lado, y contar con el cilindro transparente y

con la cámara para grabar. El análisis de las cintas es sencillo y no requiere de entrenamiento previo.

Prueba de marcha sobre escalera

El aparato para la prueba de marcha sobre escalera está hecho de plexiglás transparente (1,3 m × 20 cm) con una plataforma sólida (56 cm × 20 cm). Cada escalón de la escalera es de 3,5 mm de diámetro, con una distancia de 1 cm entre cada escalón [40]. La escalera se coloca en un ángulo de 45° sobre una tabla con espejo para posibilitar que se grabe al mismo tiempo una perspectiva lateral y una ventral.

A los animales se les entrena para cruzar la escalera y recibir una recompensa en cada extremo. Se evalúa cada paso que da el animal teniendo en cuenta si coloca bien la pata, la colocación parcial, la corrección, el reemplazo, si se resbala levemente, con fuerza o si no puede hacerlo. Para medirlo se toma el número de pasos correctos tanto ipso como contralaterales, el número de resbalones, el número de errores de cada miembro y se dividen por el número total de pasos dados con cada uno. Usando este método, Poulton et al [17] encontraron un cambio significativo en la longitud de los pasos a lo largo de las sesiones de prueba en comparación con sus evaluaciones prequirúrgicas en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA.

Otros síntomas

Conducta de giro

Este método es uno de los más utilizados para evaluar el modelo de lesión unilateral, los animales manifiestan inmediatamente después de la cirugía, y de forma espontánea, una conducta rotatoria ipsilateral a la lesión que se mantiene durante las siguientes 24 horas.

Esta conducta tienen como causa el desequilibrio existente entre el contenido de dopamina en el estriado homolateral y contralateral a la lesión, de tal forma que el animal tiende a rotar siempre hacia el lado contralateral al estriado dominante.

Este método se puede dividir en tres grandes variantes:

- *Conducta de giro espontánea*: descrita por Ungerstedt [41], controla la rotación espontánea, es decir, los animales no reciben ningún tratamiento y se prueban por intervalos de 60 minutos en los recipientes para rotación, donde se cuentan los giros completos que da el animal. Ésta es la forma más accesible ya que no requiere de aparatos sofisticados, ni sustancias químicas, pero requiere de la atención por parte del investigador.
- *Conducta de giro con agonistas dopaminérgicos como levodopa o apomorfina*: con este tipo de reto farmacológico se estimulan los receptores dopaminérgicos generando una conducta de giro ipsilateral a la lesión.
- *Conducta de giro con anfetamina*: con este fármaco los sujetos lesionados unilateralmente manifestarán una conducta de giro contralateral a la lesión.

En todos los casos, los sujetos se colocan dentro de un recipiente de rotación y se cuenta el número de giros completos que da el animal en los diferentes tiempos: 40 minutos después de apomorfina, 150 minutos después de levodopa y 270 minutos después de anfetamina [33].

Para realizar la cuenta del número de giros se utilizan varios métodos, el más básico de los cuales es contar los giros mediante la observación del investigador; sin embargo, se han desarrollado aparatos que realizan la cuenta del número de giros auto-

máticamente, lo que aumenta el coste económico, aunque disminuye el esfuerzo humano [42,43].

Existe un estudio donde se lesionó el estriado del lado derecho mediante aplicación estereotáxica de MPTP en ratones [44]; cinco días después de la cirugía se les administró anfetamina sistémica, y se evaluaron los giros completos que realizaba el animal en un período de 50 minutos. Los resultados fueron un aumento en la conducta de giro con respecto a los animales control.

Prueba elevada de oscilación del cuerpo

Esta prueba fue descrita por Borlongan et al en 1995 [45]. Las ratas son sujetadas 3 cm después de la base de la cola, y elevadas 3 cm por encima de la mesa durante 30 s, tiempo en el que se cuenta el número de oscilaciones que realiza hacia la izquierda y hacia la derecha. El conteo final se calcula de la siguiente manera: $L / (L + R)$ (%) para las oscilaciones hacia la izquierda y $R / (R + L)$ (%) para las oscilaciones hacia la derecha, donde L es el número de oscilaciones hacia la izquierda y R , hacia la derecha. Lo que se observa en este tipo de prueba es un predominio de oscilaciones en sentido contralateral a la lesión. Yuan et al [46] utilizaron esta prueba y observaron, tres y cinco semanas después de una lesión en el hemisferio izquierdo, un aumento significativo en el porcentaje de oscilaciones hacia la derecha con respecto a los controles normales.

EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE MODELOS DE MPTP EN PRIMATES NO HUMANOS

Para la evaluación de los modelos en primates con MPTP es necesario considerar las deficiencias conductuales que muestran. Este modelo tiene una mayor similitud con los síntomas que presentan los pacientes con EP, por lo que para su evaluación se han desarrollado una serie de escalas basadas en las actividades propias de los primates pero con una orientación basada en las escalas para humanos con EP. La finalidad de estos métodos es poder valorar tanto los cambios que existen cuando se lesiona un mono como la posible mejoría inducida por las distintas terapéuticas empleadas, ya sean farmacológicas o quirúrgicas.

Escalas clínicas

Todas estas escalas se aplican sobre los animales en sus jaulas y se valoran los movimientos dentro de ellas.

UPDRS [47]

Es la escala que se utiliza con mayor frecuencia para la valoración de pacientes con EP. Existe una versión basada en la sección del examen motor, pero ajustada para poder valorar primates no-humanos; compara siete signos, que son: expresión facial, 0-4; temblor en reposo, 0-4; temblor de acción o postural, 0-4; rigidez, 0-4; postura, 0-4; marcha, 0-4; bradicinesia e hipocinesia, 0-4. El máximo es 28.

Escala de Imbet [48]

Evalúa: temblor en reposo para cada brazo, 0-3; temblor de acción para cada brazo, 0-3; postura corporal, 0-3; equilibrio, 0-2; rigidez para cada brazo, 0-3; frecuencia de movimiento de brazos para cada brazo, 0-3; agudeza del movimiento, 0-1; marcha, 0-2; agilidad para trepar, 0-1; actividad general, 0-2; expresión facial, 0-1; interactividad espontánea, 0-1; interactividad tras estimulación, 0-1; vocalización, 0-1. La puntuación máxima es 39.

Escala de Benazzouz [49]

Mide: temblor, 0-3; bradicinesia, 0-3; cambios posturales, 0-3; vocalización, 0-2; congelación, 0-2; rigidez para cada brazo, 0-3; frecuencia de movimientos del brazo para cada brazo, 0-3. La puntuación va de 0 a 25.

Escala de Gómez-Mancilla [50]

Evalúa: postura, 0-2; movilidad, 0-1; escalada, 0-1; marcha, 0-1; alimentación, 0-1; preparación, 0-1; vocalización, 0-1; interacción social, 0-1; temblor, 0-1. La puntuación va de 0 a 10.

Escala de Kurlan [51]

Mide: expresión facial, 0-3; temblor en reposo, 0-3; temblor de acción o de intención, 0-3; postura, 0-2; marcha, 0-3; bradicinesia, 0-4; coordinación y balance, 0-3; habilidades gruesas del miembro superior, 0-3; habilidades gruesas del miembro inferior, 0-3; reacción defensiva, 0-2. La puntuación comprende de 0 a 29.

Escala de Papa y Chase [52]

Evalúa: postura, 0-2; marcha, 0-2; temblor, 0-2; movilidad general, 0-4; movimientos de la mano, 0-2; escalada, 0-4; sostener comida, 0-1; alimentación, 0-1; interacción social, 0-2. La puntuación va de 0 a 20.

Escala de Schneider [53]

Mide: frecuencia y capacidad de movimiento de miembros inferiores, 0-3; frecuencia y capacidad de movimiento de miembros superiores, 0-3; habilidad para manipular comida, 0-3; rango de movimiento del brazo, 0-3; bradicinesia, 0-3; hipercinesia, 0-3; temblor, 0-3; distonía, 0-3. La puntuación va de 0 a 24.

Escala de Smith [54]

Evalúa: temblor, 0-3; postura, 0-2; marcha, 0-4; bradicinesia, 0-4; coordinación y balance, 0-2; habilidades motoras gruesas, 0-3; reacción defensiva, 0-2. La puntuación va de 0 a 20.

Como podemos observar, todas las escalas tienen como objetivo valorar la conducta motora de los primates, teniendo en cuenta los signos clásicos de la EP, que son temblor, rigidez y bradicinesia, y agregando alteraciones posturales y de la marcha principalmente.

Para valorar su efectividad, Imbert et al [55] realizaron un trabajo en el que se comparan estas ocho escalas y en el que se evalúa a cinco monos cynomolgus, antes de lesionarlos, después de lesionarlos con MPTP y durante el tratamiento agudo con levodopa.

Los autores encontraron una gran variabilidad de grados de lesión y mejoría con levodopa en función de la escala utilizada para valorar al mismo animal. En general, la escala de Kurlan fue la más aguda para valorar el parkinsonismo inducido por MPTP, mientras que las escalas de Schneider y Gómez-Mancilla fueron las que tuvieron una mayor eficacia para valorar la respuesta a levodopa.

Este tipo de escalas son imprecisas porque dependen del criterio y la experiencia del observador, y además tienen rangos diferentes para valorar la misma conducta. Para poder realizar una valoración exacta, tanto del deterioro como de la mejoría inducida por el tratamiento, se han desarrollado diversos métodos para evaluar la conducta motora de los animales desde un punto de vista más cuantitativo.

Métodos automáticos

Evaluación de la actividad locomotriz

Con este método se evalúa automáticamente la actividad locomotriz de los animales, usando un sistema que comprende una cámara de vídeo conectada a un ordenador personal para analizar vídeo, el cual es capaz de calcular en tiempo real la cantidad y calidad de los movimientos de cuatro monos simultáneamente durante las sesiones de evaluación.

Las imágenes se digitalizan con una definición de 800×600 píxeles en una escala de 256 grises. El cambio en el tono de grises de una imagen a otra se cuenta cada 80 ms, lo cual permite trazar una curva de actividad. La curva de actividad puede dividirse en tres estados en general: inactividad, actividad normal e hiperactividad. Este sistema permite definir ciertas áreas de interés para valorar la actividad general y actividades en particular, como escalada, interacción social, beber y comer; esto se ve cuando el mono se encuentra en el área donde se encuentra el alimento, la bebida y las zonas designadas para la interacción social, así como para colgarse y escalar por la jaula.

Este sistema permite evaluar síntomas parkinsonianos como bradicinesia, acinesia y las conductas mencionadas, como alimentarse y beber, sin embargo no es capaz de evaluar rigidez, temblor y posturas anormales. Este sistema se ha usado al menos en dos trabajos, uno llevado a cabo por Moussaoui et al [56] y otro por Chassain et al [57]; en este último, los autores hicieron la comparación del sistema de vídeo contra una escala clínica, la de Gómez-Mancilla. En dichos trabajos se encontró que para la actividad global, los monos rhesus (*Macaca mulatta*) con MPTP pasaron más tiempo que los controles en inactividad; asimismo, los controles permanecieron más tiempo en actividad normal e hiperactividad; de igual manera, los monos control realizaron más actividades específicas que los monos con MPTP.

También se encontró una correlación entre el tiempo que pasaron en hiperactividad evaluada mediante el sistema de vídeo y la escala de Gómez-Mancilla [57].

Sistema de telemetría

Para utilizar este sistema, se le implanta a los primates en la región subescapular un transmisor en tejido subcutáneo; cada transmisor envía una señal que es detectada por un receptor y, a su vez, todos los receptores están conectados a un puerto de datos que se conecta a un ordenador para grabarlos. El receptor detecta el desplazamiento horizontal y vertical del animal; esta actividad motora se analiza mediante un *software* especial. Con este sistema es posible evaluar a seis animales de forma independiente y simultánea.

Barcia et al [58] utilizaron este sistema para evaluar la actividad motora circadiana de seis hembras adultas cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Primero, evaluaron el patrón normal de actividad para establecer la línea base de cada animal durante ocho semanas, después, tres animales fueron tratados con MPTP intravenosa cada dos semanas durante tres meses; después del procedimiento se llevaron a sus cajas y se continuó con su evaluación tras recuperarse de la anestesia y de las alteraciones agudas de la inyección con MPTP.

El promedio de la actividad de cada animal se comparó con sus datos basales y con respecto a los animales control. Los autores encontraron en las evaluaciones basales una mayor actividad diurna, baja o nula durante la noche, aunque ocasionalmente existieron picos de actividad nocturna. El momento de mayor actividad fue cuando se alimentaban y durante las siguientes ho-

ras. Los monos tratados con MPTP mostraron una disminución de la actividad motora; esta observación se aplica a todos los patrones circadianos, y es mayor después del primer mes.

Sistema webcam

Este sistema consiste en una cámara de vídeo de ordenador, con una resolución mayor a 640×480 píxeles, la cual captura imágenes en un rango de 30 cuadros por segundo; se encuentra conectada mediante un cable *firewire* a un ordenador personal que utiliza Windows como sistema operativo. La cámara está suspendida desde unos soportes metálicos unidos a la jaula de los monos a unos 30 cm por debajo del borde superior. La cámara se posiciona a unos 90 cm de la jaula, permitiendo de este modo capturar todo el frente, que es de 76 cm de alto, 63 cm de ancho y 76 cm de profundidad.

Las imágenes se capturan en intervalos de 0,5 s y el cálculo de la actividad se define como el número de píxeles que cambian entre imágenes consecutivas.

La finalidad de este método es evaluar la actividad de los sujetos en sus jaulas.

Togasaki et al [59] utilizaron este sistema para evaluar 12 monos ardilla (*Saimiri sciureus*) hembras adultas con MPTP; los autores monitorizaron a los animales durante ocho horas; el estudio se inició aproximadamente a las 9:00 h. Todas las monitorizaciones se realizaron en una habitación aislada sin la presencia de humanos. Los autores encontraron una disminución en la actividad realizada por los monos después de la administración de MPTP.

Monitor infrarrojo de actividad

Existen otros métodos para medir la actividad en el modelo de MPTP, como, por ejemplo, el monitor infrarrojo de actividad (IRAM, por sus siglas en inglés), que consiste en una caja que se atraviesa con cuatro vigas de infrarrojo, agrupadas dos en sentido anteroposterior y dos en sentido laterolateral. La actividad locomotriz se mide cuando el animal atraviesa la viga. Para registrar la cuenta de movimiento, el animal debe interrumpir otra viga que no sea la anterior, y esto se realiza en intervalos de 10 minutos [59].

Estos métodos automáticos tienen la ventaja de ser mucho más precisos y objetivos, ya que no dependen de la experiencia y el criterio del observador, y son muy útiles para evaluar la actividad de los sujetos, pero cuentan con el inconveniente de ser más costosos, ya que se necesitan los aparatos para grabar así como los ordenadores y el *software* para el análisis de las imágenes.

CONCLUSIONES

La EP es una entidad con predominio de alteraciones motoras que afectan a la calidad de vida de los pacientes, por lo que es fundamental que los tratamientos ofrezcan una mejoría en el desempeño motor. Para evaluar dichos tratamientos, es necesario contar tanto con modelos donde los animales manifiesten síntomas característicos de la EP, como con pruebas para evaluar el grado de la sintomatología y sus posibles modificaciones por las terapéuticas empleadas.

Las pruebas se pueden dividir de acuerdo con el síntoma que van a medir, es decir: temblor, rigidez, bradicinesia, alteraciones posturales, etc. Sin embargo, es difícil contar con pruebas que sean exclusivas, ya que, por ejemplo, en la prueba de

rotarod, un resultado anormal puede deberse a una deficiencia en la coordinación, bradicinesia o rigidez de algún miembro, y esto puede provocar que el animal no pueda desempeñarse de manera adecuada [60].

Antes de elegir un método para evaluar el desempeño motor de un sujeto, es fundamental analizar los factores que puedan alterar el resultado de la prueba. Sobre todo hay que considerar el estrés de la manipulación del animal [20]; se sabe que el estrés aumenta la liberación de dopamina [60] y que este fenómeno puede hacer que el sujeto tenga un mejor desempeño en las pruebas, y esto puede interpretarse como una respuesta al tratamiento sin serlo en realidad [61].

En este trabajo se describieron varias pruebas para valorar el desempeño motor de los sujetos. La mayoría están diseñadas para evaluar la actividad general, es decir, cuantificar la cantidad de movimiento, lo cual puede ser útil, ya que se ha visto que los animales con lesión en la vía nigroestriatal se mueven menos que los sujetos sanos. Sin embargo, estos métodos no son capaces de evaluar la calidad de los movimientos ni la capacidad para realizar movimientos específicos como la marcha o los movimientos de alcance de alimentos. Tampoco son capaces de evaluar conductas características como temblor o rigidez.

Por otra parte, se han desarrollado pruebas capaces de evaluar la calidad del movimiento en tareas de alcance y marcha.

Para valorar conductas específicas como el temblor, existen aparatos que miden su frecuencia; con respecto a la rigidez, existen escalas para medirla, sin embargo ninguno de estos sig-

nos se ha comunicado usualmente ya que no son fáciles de medir y no todos los animales los presentan.

Para la evaluación del modelo en primates se cuenta con escalas clínicas diseñadas para evaluar el desempeño motor; no obstante, como demostraron Imbert et al [55], éstas tienden a ser imprecisas, ya que dependen de la experiencia y el criterio del observador. Para realizar evaluaciones más objetivas, se diseñaron métodos automáticos que evalúan la actividad de los primates en sus jaulas, pero estos métodos, aunque más objetivos, no son capaces de medir conductas importantes como temblor, rigidez, alteraciones en la marcha o alteraciones en la calidad del movimiento.

Actualmente se cuenta con una serie de pruebas para medir el desempeño motor de los modelos animales de la EP; para ser más precisos, se considera de utilidad usar más de una prueba para evaluar a los animales, ya que, como se ha indicado, los resultados de estas pruebas pueden ser modificadas por varios factores y es necesario analizar las ventajas y limitaciones de cada prueba para llegar a una conclusión clara. Por otro lado, consideramos que se necesita un método que sea capaz de medir a los sujetos de forma cuantitativa no sólo en su jaula y exclusivamente en su actividad, sino también en libre movimiento, y que al mismo tiempo evalúe conductas características como marcha, o movimiento finos en conductas como alimentación, ya que este tipo de alteraciones son las que con mayor frecuencia afectan a la calidad de vida de los pacientes, y es importante demostrar que las terapias son capaces de mejorarlas.

BIBLIOGRAFÍA

- Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 363: 1783-93.
- Fuente-Fernández R, Calne DB. Evidence for environmental causation of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2002; 8: 235-41.
- Le W, Appel SH. Mutant genes responsible for Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 79-84.
- Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1991: 1-14.
- Ungerstedt U. 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 1968; 5: 107-10.
- Arai N, Migusi K, Goshima Y, Mitsu Y. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism. *Brain Res* 1990; 515: 57-63.
- Elsworth JD, Deutch AY, Redmond DE Jr, Taylor JR, Sladek JR, Roth RH. Symptomatic and asymptomatic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated primates: biochemical changes in striatal regions. *Neuroscience* 1989; 33: 323-31.
- Hoskins JA, Davis LJ. The acute effect on levels of catecholamines and metabolites in brain of a single dose of MPTP in 8 strains of mice. *Neuropharmacology* 1989; 28: 1389-97.
- Linder JC, Klemfuss H, Groves PM. Acute ultrastructural and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mice. *Neurosci Lett* 1987; 82: 221-6.
- Mitra N, Mohanakumar KP, Ganguly DK. Dissociation of serotonergic and dopaminergic components in acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Brain Res Bull* 1992; 28: 355-64.
- Bradbury AJ, Costall B, Jenner PG, Kelly ME, Marsden CD, Naylor RJ. The effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal and limbic catecholamine neurons in white and black mice. Antagonism by monoamine oxidase inhibitors. *Neuropharmacology* 1986; 25: 897-904.
- Sanberg PR, Martinez R, Shytle RD, Cahill DW. The catalepsy test. In Sanberg PR, Ossenkopp KP, Kavaliers M, eds. *Motor activity and movement disorders*. Totowa, NJ: Humana Press; 1996. p. 197-211.
- Srinivasan J, Schmidt WJ. Treatment with alpha2-adrenoceptor antagonist, 2-methoxy idazoxan, protects 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian symptoms in rats: neurochemical and behavioural evidence. *Behav Brain Res* 2004; 154: 353-63.
- Mitra N, Mohanakumar KP, Ganguly DK. Dissociation of serotonergic and dopaminergic components in acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Brain Res Bull* 1992; 28: 355-64.
- Mohanakumar KP, Muralikrishnan D, Thomas B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res* 2000; 864: 281-90.
- Schallert T, Fleming S, Leasure J, Tillerson J, Bland S. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation. *Parkinsonism and spinal cord injury. Neuropharmacology* 2000; 39: 777-87.
- Poulton NP, Muir GD. Treadmill training ameliorates dopamine loss but not behavioural deficits in hemi-Parkinsonian rats. *Exp Neurol* 2005; 193: 181-97.
- Platel A, Strolin-Benedetti M, Guffroy C. MPTP-induced decrease in motor activity in two strains of mice: its reversal by different monoamine oxidase inhibitors (MAOIs). In Markey SP, Castagnoli N Jr, Trevor AJ, Kopin IJ, eds. *MPTP: a neurotoxin producing a Parkinsonian syndrome*. Orlando, FL: Academic Press; 1986. p. 443-7.
- Fredriksson A, Archer T. MPTP-induced behavioural and biochemical deficits: a parametric analysis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1994; 7: 123-32.
- Sundström E, Henriksson BG, Mohammed AH, Souverbie F. MPTP-treated mice: a useful model for Parkinson's disease? In Woodruff ML, Nonneman AJ, eds. *Toxin-induced models of neurological disorders*. New York: Plenum Press; 1994. p. 181-8.
- Muralikrishnan D, Mohanakumar KP. Neuroprotection by bromocriptine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice. *FASEB J* 1998; 12: 905-12.
- Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP, Schwarting RKW. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet* 2000; 30: 171-82.
- Tasaki Y, Makino Y, Ohta S, Hirobe M. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, decreasing in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse, prevents parkinsonism-like behavior abnormalities. *J Neurochem* 1991; 57: 1940-3.
- Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, Ono T, Watanabe Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985; 50: 435-41.
- Ogawa N, Mizukawa K, Hirose Y, Kajita S, Ohara S, Watanabe Y. MPTP-induced Parkinsonian model in mice biochemistry, pharmacology and behavior. *Eur Neurol* 1987; 26 (Suppl 1): 16-23.
- Wagner GC, Walsh SL. Increased sensitivity of mice to tremorogenic agents following MPP+. *Psychopharmacol Berl* 1987; 92: 470-2.

27. Chang FW, Wang SD, Lu KT, Lee EH. Differential interactive effects of gliotoxin and MPTP in the substantia nigra and the locus coeruleus in BALB/c mice. *Brain Res Bull* 1993; 31: 253-66.
28. Gupta M, Gupta BK, Thomas R, Bruemmer V, Sladek JR Jr, Felten DL. Aged mice are more sensitive to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment than young adults. *Neurosci Lett* 1986; 70: 326-31.
29. Bradbury AJ, Costall B, Domeney AM, Jenner P, Kelly ME, Marsden CD, et al. 1-Methyl-4-phenylpyridine is neurotoxic to the nigrostriatal dopamine pathway. *Nature* 1986; 319: 56-7.
30. Bonuccelli U, Fariello RG. Evidence for an epileptogenic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuropharmacology* 1989; 28: 1419-22.
31. Bonuccelli U, Garant D, Fariello R. The acute convulsant effect of MPTP is dependent on intracerebral MPP+. *Neurosci Lett* 1991; 124: 22-6.
32. Duvoisin RC, Heikkilä RE, Nicklas WJ, Hess A. Dopaminergic neurotoxicity of MPTP in the mouse: a murine model of parkinsonism. In Fahn S, Marsden CD, Jenner P, Teychenne P, eds. *Recent developments in Parkinson's disease*. New York: Raven Press; 1986. p. 147-54.
33. Metz GA, Whishaw IQ. Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. *Neuroscience* 2002; 111: 325-36.
34. Colotta VA, Flores E, Oscos A, Meneses A, Tapia R. Effects of MPTP on locomotor activity in mice. *Neurotoxicol Teratol* 1990; 12: 405-7.
35. Monville C, Torres EM, Dunnett SB. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J Neurosci Methods* 2006; 158: 219-23.
36. Henderson JM, Dunnett SB. Targeting the subthalamic nucleus in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 1998; 46: 467-74.
37. Henderson JM, Watson SH. Convulsive and postural effects of lesioning the mid-substantia nigra pars reticulata in naïve and 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res Bull* 2003; 60: 179-85.
38. Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM. Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res* 2006; 169: 1-9.
39. Vergara-Aragón P, González CLR, Whishaw IQ. A novel skilled-reaching impairment in paw supination on the 'good' side of the hemi-Parkinson rat improved with rehabilitation. *J Neurosci* 2003; 23: 579-86.
40. Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods* 2002; 115: 169-79.
41. Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 1971; 367: 89-93.
42. Whishaw IQ, Coles BLK, Pellis SM, Miklyayeva EI. Impairments and compensation in mouth and limb use in free feeding after unilateral dopamine depletions in a rat analog of human Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 1997; 84: 167-77.
43. Inaji M, Okauchi T, Ando K, Maeda J, Nagai Y, Yoshizaki T, et al. Correlation between quantitative imaging and behavior in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res* 2005; 1064: 136-45.
44. Fung YK, Troxel CE. Amphetamine-induced circling behaviour in MPTP-lesioned mice. *J Pharm Pharmacol* 1985; 37: 922-3.
45. Borlongan CV, Sanberg PR. Elevated body swing test: a new behavioural parameter for rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism. *J Neurosci* 1995; 15: 5372-8.
46. Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 2005; 144: 35-45.
47. Fahn S, Elton RL. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In Fahn S, Marsden CD, eds. *Recent developments in Parkinson's disease*. 2 ed. Florham Park: Macmillan Health Care; 1987. p. 153-64.
48. Imbert C, Bezard E, Gross CE. A new rating scale for assessment of MPTP-induced parkinsonism in monkeys. *Fr Soc Neurosci Bordeaux* 1997; 3: 212.
49. Benazzouz A, Boraud T, Dubedat P, Boireau A, Stutzmann JM, Gross C. Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the rhesus monkey: a preliminary study. *Eur J Pharmacol* 1995; 284: 299-307.
50. Gómez-Mancilla B, Bedard PJ. Effect of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesia in MPTP-treated monkeys. *Clin Neuropharmacol* 1993; 16: 418-27.
51. Kurlan R, Kim MH, Gash DM. Oral levodopa dose-response study in MPTP induced hemiparkinsonian monkeys: assessment with a new rating scale for monkey parkinsonism. *Mov Disord* 1991; 6: 1-8.
52. Papa SM, Chase TN. Levodopa-induced dyskinesias improved by a glutamate antagonist in parkinsonian monkeys. *Ann Neurol* 1996; 39: 574-8.
53. Schneider JS, Lidsky TI, Hawks T, Mazziotta JC, Hoffman JM. Differential recovery of volitional motor function, lateralized cognitive function, dopamine agonist-induced rotation and dopaminergic parameters in monkeys made hemi-parkinsonian by intracarotid MPTP infusion. *Brain Res* 1995; 672: 112-27.
54. Smith RD, Zhang Z, Kurlan R, McDermott M, Gash DM. Developing a stable bilateral model of parkinsonism in rhesus monkeys. *Neuroscience* 1993; 52: 7-16.
55. Imbert C, Bezard E, Guiraud S, Boraud T, Gross CE. Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the Macaque monkey. *J Neurosci Methods* 2000; 96: 71-6.
56. Moussaoui S, Obinu MC, Daniel N, Reibaud M, Blanchard V, Imperato A. The antioxidant Ebselen prevents neurotoxicity and clinical symptoms in a primate model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2000; 166: 235-45.
57. Chassain C, Eschalier A, Durif F. Assessment of motor behavior using a video system and clinical rating scale in parkinsonian monkeys lesioned by MPTP. *J Neurosci Methods* 2001; 111: 9-16.
58. Barcia C, De Pablos V, Bautista-Hernández V, Sánchez-Bahillo A, Fernández-Barreiro A, Poza M, et al. Measurement of motor disability in MPTP-treated macaques using a telemetry system for estimating circadian motor activity. *J Neurosci Methods* 2004; 134: 59-64.
59. Togasaki DM, Hsu A, Samant M, Farzan B, DeLanney LE, Langston JW, et al. The Webcam system: a simple, automated, computer-based video system for quantitative measurement of movement in nonhuman primates. *J Neurosci Methods* 2005; 145: 159-66.
60. Sedelis M, Schwarting RKW, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2001; 125: 109-22.
61. Weihmuller FB, Hadjiconstantinou M, Bruno JP. Acute stress or neuroleptics elicit sensorimotor deficits in MPTP-treated mice. *Neurosci Lett* 1988; 85: 137-42.

EVALUATION OF MOTOR DISORDERS IN ANIMAL MODELS OF PARKINSON'S DISEASE

Summary. Introduction. *The diagnosis of Parkinson's disease is essentially clinical, that is to say, it is based on the observation of the motor alterations displayed by patients, and for this reason it is considered to be a simple matter. Yet, only 75% of the diagnoses that are carried out clinically are later confirmed in the autopsy. Animal models can be generated by systemic or intracerebral application of neurotoxins, like 6-hydroxydopamine (6-OHDA) for rats or 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) for mice and non-human primates, which induce damage in the nigrostriatal dopaminergic system. This gives rise to a variety of motor symptoms such as akinesia, bradykinesia, rigidity, tremor, gait disorders and abnormal postures, which is what makes the evaluation of the changes in the signs of parkinsonism in animal models such a challenge to researchers today.* Development. *The paper reviews the variety of paradigms available for evaluating these symptoms in mouse, rat and non-human primate models, which have been used to measure the differences brought about by applying neurotoxins and, in some cases, the improvements produced by different treatments for the Parkinsonian syndromes that were induced.* Conclusions. *Both the general findings of these works and the factors that influence the trials are discussed, together with the potential problems and benefits that the experimental procedures may have.* [REV NEUROL 2008; 46: 167-74]

Key words. 6-OHDA. Animal models. Motor evaluation. MPTP. Parkinsonism. Primates. Rodents.

2. ANTECEDENTES

2.1 Otras Aproximaciones terapéuticas

Como vemos la EP es una patología compleja, y aunque el tratamiento farmacológico resuelve momentáneamente algunos de los síntomas, no consigue generar una mejoría a largo plazo. Por este motivo se han desarrollado una serie de aproximaciones terapéuticas.

El trasplante de células productoras de dopamina en el estriado se ha considerado un abordaje racional en la EP por los siguientes motivos:

- Existe un daño selectivo en una población neuronal concreta (SNc), que se traduce en un déficit neuroquímico específico (DA) en un área definida (el cuerpo estriado).
- Los fármacos dopaminérgicos producen un importante beneficio, por lo que este déficit neuroquímico es responsable de una parte importante de su expresión clínica.
- Mientras que la administración oral de levodopa induce una estimulación pulsátil de los receptores postsinápticos, las células dopaminérgicas implantadas podrían restaurar el déficit neuroquímico de una forma sostenida y fisiológica.
- El estriado (putamen y caudado) es una estructura fácilmente accesible por cirugía.

Bajo estos supuestos, a finales de la década de 1970 se iniciaron los primeros trasplantes experimentales en el modelo de la rata con lesión unilateral por 6-OHDA (Björklund y Stenevi, 1979; Perlow et al., 1979). Entre las diferentes estirpes de células dopaminérgicas ensayadas, los mejores resultados se obtuvieron con las células nigrales mesencefálicas (Björklund y Stenevi, 1979; Perlow et al., 1979; Björklund et al., 1980; Björklund et al., 1981; Dunnett et al., 1981) y las células cromafines de la médula adrenal (Freed et al., 1981; Herrera-Marchitz et al., 1984). En estos estudios se observó que las células implantadas podían sobrevivir, producir DA y mejorar los trastornos motores en este modelo experimental. Más tarde, estos hallazgos se reprodujeron en el modelo del primate tratado con MPTP, tanto con células mesencefálicas (Redmond et al., 1986; Sladek et al., 1987; Bakay et al., 1987), como con células de la médula adrenal (Bankiewicz et al., 1988; Hansen et al., 1988). En éstos, y en subsiguientes estudios (Freund et al., 1985; Strecker et al., 1987; Dunnett et al., 1988; Brundin et al., 1989; Bankiewicz et al., 1990), se demostró que la persistencia del beneficio motor se correlaciona con la supervivencia e integración funcional del tejido implantado. En éste sentido, los resultados han sido superiores con mesencéfalo fetal: los implantes llegan a sobrevivir más tiempo, reinervan el estriado y forman

conexiones sinápticas, lo que se acompaña de recuperación funcional. No obstante, también se estudiaron métodos que podían aumentar la supervivencia del tejido adrenal, como la infusión de factor de crecimiento nervioso (NGF) (Strömberg et al., 1985) y, más tarde, se realizaron cotrasplantes de médula adrenal con otros tejidos que pudieran aportar éste u otros factores neurotróficos, como células de glioma (Bing et al., 1990), o fragmentos de nervio periférico (Kordower et al., 1990; Watts et al., 1995). Estas experiencias establecieron que los factores neurotróficos podían aumentar la viabilidad de las células implantadas, e inducir además la arborización de las fibras dopaminérgicas del cerebro huésped.

Tras los primeros trabajos en el laboratorio, hacia la mitad de la década de los ochenta se iniciaron los primeros estudios clínicos en pacientes con EP (Backlund et al., 1985; Lindvall et al., 1987). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los principios enunciados en los que se apoya la terapia celular no son tan concluyentes en la EP humana como en los modelos animales actuales: mientras que en éstos el daño neuronal es agudo o subagudo, y afecta de forma más selectiva a las neuronas dopaminérgicas (Beal, 2001), la EP es en realidad un proceso progresivo, en el que se afectan también otras poblaciones neuronales y sistemas neuroquímicos (Braak et al. 2003). En la actualidad, después de 20 años de experiencia básica y clínica, se considera que el objetivo de una auténtica terapia neuroregenerativa para la EP no debería ser únicamente reemplazar el déficit dopaminérgico, sino hacerlo de una forma más fisiológica (Mínguez-Castellanos y Escamilla-Sevilla, 2005).

Trasplantes de médula adrenal

Tras las primeras evidencias en modelos animales, a partir de 1985 se publicaron los primeros estudios clínicos en pacientes con EP con la utilización de médula adrenal autóloga (Backlund et al., 1985; Lindvall et al., 1987). La técnica utilizada por este grupo sueco en cuatro pacientes fue, al igual que en la experimentación animal, la implantación estereotáctica unilateral en el estriado. Los resultados clínicos fueron modestos, pero suficientemente estimulantes para extender la investigación clínica a diversos países. En 1987, un grupo mexicano publicó sus primeros resultados en dos pacientes (Madrado et al., 1987). La técnica utilizada era diferente: mediante cirugía abierta, implantaron unilateralmente fragmentos de médula adrenal en una cavidad creada en el núcleo caudado, en comunicación con el ventrículo lateral. Los resultados comunicados fueron espectaculares, y se confirmaron posteriormente en una serie de 42 pacientes (Madrado et al., 1990a). A partir de entonces los trasplantes de médula adrenal comenzaron a realizarse en centros de todo el mundo (López-Lozano et al., 2000), aunque sin obtener por lo general los mismos resultados.

Las técnicas quirúrgicas utilizadas en los trasplantes de médula adrenal han sido diversas: mientras que numerosos grupos siguieron la técnica de cirugía abierta propuesta por Madrazo et al (Penn et al., 1988; Kelly et al., 1989; Jankovic et al., 1989; Leiberman et al., 1989; López-Lozano et al., 1990), otros realizaron implantes de cantidades variables de tejido mediante cirugía estereotáctica en el putamen o en el caudado, más frecuentemente de forma unilateral (Jiao et al., 1989; Cahill y Olanow, 1990; Apuzzo et al., 1990). La adrenalectomía previa se realizó por vía abdominal o, en algunos casos, por vía retroperitoneal (Apuzzo et al., 1990; Goetz et al., 1991), y se utilizaron distintas técnicas de perfusión y preparación del tejido (López-Lozano et al., 1989). El grupo mexicano también realizó, en algunos pacientes, trasplantes de médula adrenal fetal (Madrazo et al., 1990a; Madrazo et al., 1990b).

Los resultados obtenidos son de difícil sistematización, teniendo en cuenta la variabilidad en la selección de los pacientes, en las técnicas quirúrgicas y en las evaluaciones clínicas. Todos los estudios publicados han sido abiertos, la mayoría con pocos pacientes (entre 3 y 20) y sin grupo control. El tiempo de seguimiento ha sido variable (entre 6 meses y 2 años) y las evaluaciones 'no cegadas'. En general, los resultados de cada centro han sido heterogéneos y se han expuesto de forma diversa, y es habitual destacar la existencia de cambios en la duración y gravedad de los períodos de apagado. La proporción de pacientes que han obtenido una mejoría clínica relevante ha variado: al año de la intervención mantenían un buen resultado 1 de 7 pacientes (Penn et al., 1988), 4 de 12 (Allen et al., 1989) y hasta 4 de 8 pacientes intervenidos (Apuzzo et al., 1990).

Por otro lado mediante esta técnica se ha logrado bajar la dosis de levodopa hasta en un 60% (López-Lozano et al., 1990; López-Lozano et al., 1991). Desde el punto de vista neuropsicológico, en un estudio se ha descrito mejoría de los trastornos cognitivos de tipo frontal en 7 pacientes a los 3 meses de la cirugía (Ostrosky-Solís et al., 1988).

En la mayoría de los estudios se ha documentado una alta morbi-mortalidad relacionada con la doble cirugía abdominal y craneal (Waxman et al., 1991). La morbilidad fue menor en los casos intervenidos mediante cirugía retroperitoneal, así como en los que se realizó la implantación mediante estereotaxia (Goetz et al., 1991).

En estudios de laboratorio, la supervivencia a largo plazo de los trasplantes de médula adrenal ha sido escasa (Freed et al., 1986). Con respecto a los estudios clínicos, Guttman et al., 1989 siguieron mediante PET con 18F-dopa a 5 pacientes intervenidos unilateralmente en el caudado: a los 6 meses no se detectó de forma convincente mejoría funcional en el lado implantado (Guttman et al., 1989). En distintos estudios post mortem realizados varios meses después del trasplante se ha encontrado la existencia de una cavidad necrótica con gliosis reactiva, pero las células cromafines

eran muy escasas (Hurting et al., 1989; Waters et al., 1990; Kordower et al., 1991), o estaban ausentes (Jankovic et al., 1989; Peterson et al., 1989; Hirsch et al., 1990; Forno y Langston, 1991). En definitiva, aunque se ha comunicado la mejoría clínica de algunos pacientes, las evidencias clínicas y neuropatológicas sugieren, al igual que en los estudios de laboratorio, una baja supervivencia e integración funcional del tejido implantado.

Distintas evidencias experimentales demostraron que la supervivencia de la médula adrenal aumenta si se añaden factores tróficos, bien de forma directa (Strömberg et al., 1985) o mediante el cotrasplante con otros tejidos que los aportaran (Bing et al., 1990; Kordower et al., 1990; Watts et al., 1995). También se han llevado a cabo estudios clínicos en este sentido.

Olson y colaboradores realizaron una infusión intraestriatal de NGF durante las semanas posteriores a un trasplante de médula adrenal en un paciente, y al año se documentó una modesta mejoría (Olson et al., 1991).

López-Lozano y su grupo realizaron, mediante cirugía abierta en el núcleo caudado, cotrasplantes de médula adrenal y nervio periférico intercostal en 8 pacientes con EP avanzada, y comunicaron una mejoría media progresiva en la United Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS) en el tiempo de encendido, que se mantenía más de 2 años después.

A pesar de que los cotrasplantes podrían aportar mejores resultados, la realidad es que los trasplantes de médula adrenal se han abandonado en la actualidad. A ello ha contribuido la inconsistencia de los resultados básicos y clínicos, su elevada morbi-mortalidad y el desarrollo de otras alternativas experimentales.

Trasplantes de mesencéfalo fetal humano

Basado en los mejores resultados obtenidos en modelos animales, Lindvall y colaboradores realizaron por primera vez trasplantes de mesencéfalo fetal humano mediante estereotaxia en 2 pacientes con EP (Lindvall et al., 1989). Este grupo sueco publicó posteriormente nuevos trabajos basados en su serie inicial de 4 pacientes, y documentaron una mejoría progresiva que se inició a los 2-3 meses y continuó durante los 3 años de control clínico (Lindvall et al., 1990; Lindvall et al., 1992; Lindvall et al., 1994; Hoffer et al., 1992). A partir de entonces, otros grupos comenzaron a realizar estos trasplantes en distintos países. El grupo de Madrazo, en México, realizó trasplantes mediante cirugía abierta en el núcleo caudado (Madrazo et al., 1990a; Madrazo et al., 1990b), técnica que siguieron los grupos español y cubano (López-Lozano et al., 2000). Por el contrario, otros grupos en Estados Unidos y Francia siguieron la técnica estereotáctica empleada por el grupo sueco. Se estima que cientos

de pacientes con EP se han sometido a este tipo de trasplante en el mundo, y existe información en la literatura médica respecto a unos 50 (Goetz et al., 2002).

Al analizar los estudios publicados, lo primero que llama la atención es la gran variabilidad en los procedimientos:

- El tejido donante se ha obtenido de embriones o fetos, procedentes de abortos entre 5-17 semanas postconcepción. En estudios animales se ha determinado que la supervivencia e integración funcional se reduce considerablemente a partir de las 10 semanas de edad, por lo que la mayoría de grupos ha utilizado donantes de entre 6 y 9 semanas.
- La cantidad de tejido implantado ha oscilado entre 1 y 4 mesencéfalos fetales por hemisferio (hasta 8 donantes en casos de cirugía bilateral).
- Se han utilizado distintas técnicas de conservación y almacenamiento del tejido.
- Los implantes pueden ser de fragmentos de tejido (de mayor o menor tamaño, incluso 'hebras' de tejido) o bien agregados celulares (con mayor o menor dispersión).
- Algunos grupos han realizado trasplantes mediante cirugía abierta (en el núcleo caudado derecho); pero la mayoría de los grupos han utilizado cirugía estereotáctica (en uno o varios puntos del putamen, caudado o ambos; de forma unilateral o bilateral, en uno o dos tiempos).
- En muchos estudios se ha utilizado inmunosupresión previa y posterior (habitualmente con ciclosporina), con duración variable.

Al igual que se comentó respecto a los trasplantes de médula adrenal, es difícil sistematizar los resultados clínicos de los distintos estudios debido a la variabilidad en la selección de los pacientes y en la metodología utilizada. No obstante, las evaluaciones clínicas han sido, por lo general, más homogéneas que en los estudios con médula adrenal: se han utilizado con mayor frecuencia escalas validadas como la UPDRS, y diversos grupos han seguido el protocolo: Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT) (Langston et al., 1992).

En general, los cambios postquirúrgicos más destacados han sido el aumento del tiempo en situación encendido y la mejoría de los síntomas en apagado, especialmente la rigidez y la bradicinesia. Las discinesias en encendido se han reducido en diversos estudios (Freeman et al., 1995; Defer et al., 1996; López-Lozano et al., 1997; Kopyov et al., 1997), aunque también se han incrementado en algunos pacientes (Freed et al., 1990; Freed et al., 1992; Defer et al., 1996). La latencia para el inicio de la mejoría varía (desde inmediatamente hasta 3-6 meses después), y alcanza su máximo entre 6 meses y 2 años. Posteriormente, es probable que exista un empeoramiento progresivo en muchos pacientes, aunque en otros se ha descrito persistencia de la mejoría hasta 5 años (López-Lozano et al., 1997), e incluso 10 años después (Piccini et al., 1999). Con

respecto a la medicación, en algunos centros han conseguido reducir la dosis de levodopa en un porcentaje variable. El grupo sueco suprimió la levodopa en 2 pacientes durante años (Lindvall et al., 1994). Otros grupos han logrado reducciones medias del 39% (Freed et al., 1990; Freed et al., 1992), e incluso del 60% a los 5 años (López-Lozano et al., 1997).

Todos los estudios sobre trasplante de mesencéfalo fetal humano destacan que es un procedimiento, por lo general, bien tolerado. No obstante, se han descrito complicaciones potencialmente serias como hemorragias intracraneales (Freeman et al., 1995; Hauser et al., 1999; Kopyov et al., 1997; Freed et al., 2001), que con frecuencia se resolvieron sin secuelas. Otros pacientes han presentado crisis convulsivas (Spencer et al., 1992), o cuadros confusionales postquirúrgicos (López-Lozano et al., 1997; Freed et al., 2001; Olanow et al., 2003). Se ha descrito el caso de un paciente que falleció tras desarrollar una hidrocefalia obstructiva por migración del tejido implantado al cuarto ventrículo; el estudio post mortem reveló que se trataba de un material compuesto de hueso, cartílago, pelo y epitelio escamoso (Folkerth y Durso, 1996). Este caso, sin embargo, se relaciona claramente con una incorrecta identificación y disección del tejido trasplantado. El tratamiento inmunosupresor se ha asociado en algunos pacientes con afectación renal (Lindvall et al., 1994; Freeman et al., 1995; Hauser et al., 1999), o infecciones oportunistas (López-Lozano et al., 1997), sobre todo cuando se ha mantenido a largo plazo.

Los dos estudios controlados con placebo han puesto en evidencia un efecto adverso de reciente descripción: la aparición de discinesias persistentes en los períodos de apagado, generalmente en forma de movimientos estereotipados de los miembros inferiores, semiológicamente similares a las denominadas discinesias bifásicas (Freed et al., 2001; Olanow et al., 2003). En el estudio de Freed et al aparecieron en el 15% de los pacientes trasplantados tras 3 años de control clínico; todos ellos eran ≤ 60 años y habían mejorado clínicamente (Freed et al., 2001). En el estudio de Olanow et al aparecieron hasta en el 56% a los 2 años; se iniciaron a los 6-12 meses y llegaron a ser graves en 3 pacientes (Olanow et al., 2003). En este último estudio, no existió correlación entre la aparición de estas discinesias y la puntuación en la escala UPDRS, la cantidad de tejido implantado, o la captación estriatal de ^{18}F -dopa. Curiosamente, las discinesias en los períodos de encendido no habían empeorado en estos pacientes, ni habían incrementado la dosis de medicación.

En las principales series sobre trasplantes de mesencéfalo fetal se han realizado estudios seriados mediante PET con ^{18}F -dopa, y se ha descrito con frecuencia un incremento progresivo de la captación en el área del trasplante, junto con una disminución progresiva en áreas del estriado no trasplantadas. En los estudios abiertos,

la exposición de estos datos es heterogénea: en algunos se hace referencia a pacientes individuales, y en otros a cambios medios en un grupo de pacientes. Los dos recientes estudios controlados con placebo también han demostrado un incremento medio en la captación putaminal de 18F-dopa al año del trasplante (Freed et al., 2001; Olanow et al., 2003), con mínimo incremento posterior durante el segundo año (Olanow et al., 2003) Estos cambios medios fueron significativamente diferentes respecto al grupo placebo en ambos estudios.

En resumen, los hallazgos en el PET sugieren que las células implantadas pueden restaurar a mediano y largo plazo la función dopaminérgica estriatal, y alcanzar generalmente el 48-68% de los valores normales en la captación de 18F-dopa. La persistencia de este efecto neuroquímico hasta 10 años después en algunos pacientes podría hacer pensar que estas células no se ven afectadas por el proceso de la enfermedad (Dunnet et al., 2001).

Los dos recientes estudios controlados con cirugía placebo han demostrado que los trasplantes de mesencéfalo fetal humano, realizados con las técnicas más habituales, no modifican sustancialmente la situación clínica global de los pacientes con EP avanzada a medio-largo plazo, y se asocian con la aparición de discinesias en situación de apagado en una alta proporción. Si a éstos hechos se añaden las limitaciones para la obtención de suficiente tejido fetal humano y los problemas ético-legales relacionados, difícilmente este procedimiento podrá llegar a ser en el futuro un tratamiento apropiado para esta enfermedad.

Mendez y colaboradores reportaron los análisis de cinco sujetos con EP los cuales fueron trasplantados con mesencéfalo fetal 9-14 años antes. Los estudios post mortem mostraron que las neuronas tanto dopaminérgicas como serotoninérgicas sobrevivieron sin signos de neurodegeneración a pesar de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y otras estructuras en el cerebro parkinsoniano huésped. Esto probó que bajo condiciones apropiadas de integración y baja reacción inflamatoria las neuronas pueden evitar la degeneración a largo plazo (Mendez et al., 2008). Por otro lado el grupo de Li reportó que las células trasplantadas pueden sobrevivir hasta 16 años en sujetos con EP. Un gran número de neuronas dopaminérgicas se encontraron en dos sujetos que recibieron trasplante bilateral de tejido mesencefálico fetal. En ambos sujetos la mayoría de células dopaminérgicas tuvieron largos procesos y formaban densas redes en los trasplantes y los alrededores del estriado. Ambos sujetos fallecieron de causas no relacionadas con los trasplantes. En sus sustancias negras se encontraron cambios histopatológicos característicos de una EP severa: pérdida de neuronas pigmentadas y cuerpos de Lewy positivos a α -sinucleína y ubiquitina, así como neuritas de Lewy en las neuronas sobrevivientes. En cuanto más

tiempo tenía el trasplante mayor fue la cantidad de células TH positivas que contenían cantidades detectables de α -sinucleína. Éste aumento en la cantidad de α -sinucleína y la formación de cuerpos de Lewy puede ser perjudicial para las neuronas dopaminérgicas trasplantadas y potencialmente limitar la duración y eficiencia de la terapia de reemplazo celular (Li et al., 2008). En otro estudio se analizó el tejido de un sujeto 14 años después de haber recibido el trasplante de mesencéfalo fetal al igual que en el anterior se encontraron una gran número de células TH positivas con grandes cantidades de α -sinucleína, es notable que el sujeto inicialmente tuvo una mejoría sintomática importante, pero su función motora se fue deteriorando. Éste deterioro pudo ser debido a una falla del tejido trasplantado causado por el proceso propio de la EP o por una respuesta inmune como sugiere una extensa infiltración del trasplante por microglia. En ambos casos el tejido trasplantado puede verse limitado y por consecuencia la mejoría clínica de este tipo de tratamientos (Kordower et al., 2008).

Trasplante de mesencéfalo embrionario porcino

Los trasplantes entre especies (xenotrasplantes) podrían suponer una solución a los problemas de disponibilidad de tejidos y órganos. En modelos animales de EP, las células del mesencéfalo ventral del cerdo en desarrollo son capaces de sobrevivir en el estriado y corregir las deficiencias motoras (Freeman et al., 1988; Isacson et al., 1995; Galpern et al., 1996).

Schumacher y colaboradores han llevado a cabo un estudio abierto en 12 pacientes con EP avanzada, mediante la implantación unilateral en caudado y putamen de células en suspensión procedentes de embriones porcinos de 25-28 días (aproximadamente 12 millones de células por paciente) (Schumacher et al., 2000) Seis pacientes siguieron tratamiento inmunosupresor con ciclosporina oral en bajas dosis, mientras que los otros seis recibieron células tratadas con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno principal de histocompatibilidad de clase I. Al año del control clínico ($n = 10$), los autores destacan una mejoría media estadísticamente significativa en la escala UPDRS en situación de apagado (19%), a expensas de la subescala II de actividades cotidianas.

Sin embargo, en el análisis de los resultados individuales, dos pacientes no mejoraron, y sólo tres tuvieron una reducción en la UPDRS total mayor del 30% (34-51%). Estos últimos también tuvieron mejoría en las pruebas cronometradas de ambos miembros superiores, pese a que el trasplante fue unilateral. La mejoría ya estaba presente a los tres meses del trasplante, y no se encontraron claras diferencias clínicas entre los pacientes tratados o no con ciclosporina. Aunque no hubo cambios globales en la medicación, los tres pacientes que más mejoraron habían incrementado ligeramente la

dosis. En el PET con 18F-dopa no hubo cambios significativos al año, ni diferencias entre el hemisferio trasplantado y el contralateral. Un paciente falleció a los siete meses del trasplante y el estudio post mortem mostró escasas células porcinas únicamente en el putamen –unas 638 células TH positivas, con crecimiento de axones unos 500 µm hacia el estriado huésped (Deacon et al., 1997). Este paciente recibió tratamiento con ciclosporina, y los estudios morfológicos e inmunohistoquímicos (marcadores de microglia y células T) mostraron una mínima reacción inflamatoria.

En definitiva, con la metodología utilizada, la supervivencia e integración funcional de estos trasplantes parece ser mínima y los resultados clínicos poco consistentes. Se ha realizado posteriormente un estudio doble ciego controlado con placebo, en el que no se han encontrado diferencias significativas entre ambos grupos (Stocchi y Olanow, 2003). Además, el riesgo de transmitir infecciones entre especies, y la posible necesidad de inmunosupresión, son también factores limitantes para el desarrollo futuro de los xenotrasplantes.

Trasplante de células retinianas microencapsuladas

El epitelio pigmentado de la retina contiene células productoras de levodopa y DA, que pueden cultivarse y encapsularse con microtransportadores de gelatina (Esferamina®). Se ha demostrado en estudios experimentales que estas células microencapsuladas pueden sobrevivir en el estriado de ratas y primates, y producir mejoría del déficit motor. La reacción inflamatoria que producen en el cerebro huésped es mínima en ausencia de inmunosupresión (Subramanian et al., 2002). Asimismo, en monos tratados con MPTP se ha demostrado, mediante PET con 18F-dopa y con 11C-raclopride, que estas células liberan DA in vivo y no presentan problemas de seguridad a largo plazo (Watts et al., 2003).

Éste mismo grupo ha llevado a cabo un estudio piloto en seis pacientes con EP avanzada (Watts et al., 2003). A cada paciente se le implantaron aproximadamente 325.000 células microencapsuladas de procedencia humana en la parte posterior del putamen más afectado, sin utilizar tratamiento inmunosupresor. A los 6 meses del trasplante, la puntuación media en la escala UPDRS III en apagado mejoró en un 33% –los valores individuales oscilaron entre el 18 y el 46%–, y al año ($n = 3$) aumentaron en un 48%. En todos los pacientes la mejoría ya era importante en el primer mes tras la cirugía y progresó hasta el año. El procedimiento se toleró bien, aunque un paciente presentó una pequeña hemorragia putaminal postquirúrgica sin repercusión clínica. Específicamente, se destaca la ausencia de discinesias en situación de apagado tras el trasplante.

En resumen, estas células microencapsuladas podrían funcionar durante un tiempo como 'bombas' de dopamina, pero no existen datos de su posible integración funcional en el estriado, ni parece probable que ejerzan efectos tróficos sobre el cerebro huésped.

Trasplante de agregados celulares del cuerpo carotídeo

El cuerpo carotídeo contiene células glómicas dopaminérgicas que actúan como quimiorreceptores, y detectan principalmente cambios en la presión parcial de oxígeno de la sangre arterial (López-Barneo et al., 1988; Ureña et al., 1994). La posibilidad de trasplantar estas células en modelos animales de EP fue investigada en los años ochenta por el grupo de Gash, pero sus resultados conductuales e histológicos fueron negativos (Bing et al., 1988). Años después, tras profundizar en el estudio de la fisiología celular del cuerpo carotídeo, López-Barneo et al observaron que las células glómicas reúnen una serie de características que las hacen especialmente interesantes para la terapia celular en la EP (Espejo et al., 1998; Toledo-Aral et al., 2002; Toledo-Aral., 2003):

- Tienen similitudes con las neuronas dopaminérgicas: proceden embriológicamente de la cresta neural, son células excitables (generan potenciales de acción) y forman sinapsis con otras neuronas.
- Al contrario de lo que ocurre con la mayoría de células y tejidos, la hipoxia presente durante el proceso de trasplante favorece su crecimiento y capacidad funcional (McGregor et al., 1984; Czyzyk_Krzeska et al., 1992).
- Sintetizan altos niveles de factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) y de su familia de ligandos y receptores, por lo que podrían poseer una auténtica capacidad trófica (Toledo-Aral et al., 2003; Nosrat et al., 1996; Leitner et al., 2005; Villadiego et al., 2005). En este sentido, es interesante destacar que este factor neurotrófico está ausente en otros tejidos catecolaminérgicos, como la médula adrenal, el ganglio cervical superior y las células pigmentarias de la retina (Villadiego et al., 2005).
- Pueden proceder del mismo individuo (autotrasplante), y hacer innecesaria la inmunosupresión.
- El cuerpo carotídeo es fácilmente accesible, y su resección unilateral no conlleva problemas clínicos relevantes (Honda, 1992).

En lugar de utilizar células glómicas aisladas, que habitualmente pierden sus características fisiológicas, el grupo de López-Barneo trasplantó en el estriado agregados celulares del cuerpo carotídeo, tanto en ratas con lesión unilateral por 6-OHDA (Espejo et al., 1998; Toledo-Aral et al., 2003), como en primates tratados con MPTP (Luquin et al., 1999). En ambos modelos animales se consiguió recuperar las

deficiencias motoras, y se observó en el estudio histológico una abundante reinervación estriatal, incluso en áreas alejadas del implante (Espejo et al., 1998; Luquin et al., 1999). En experimentos posteriores se ha demostrado que estos efectos se mantienen a largo plazo y se relacionan con la restauración neurotrófica del sistema nigroestriatal del huésped, para lo cual deben cumplirse dos condiciones: 1) que las células trasplantadas sobrevivan, y 2) que el daño producido por la enfermedad sea parcial (Toledo-Aral et al., 2003). Las células glómicas implantadas sintetizan altos niveles de GDNF, entre otros factores tróficos (Toledo-Aral et al., 2003; Nosrat et al., 1996; Leitner et al., 2005; Villadiego et al., 2005), los cuales podrían captarse retrógradamente por los axones nigroestriatales todavía viables e inducir su arborización y recuperación funcional. Este mecanismo trófico explicaría la aparente desproporción entre el relativamente escaso número de células glómicas implantadas y la intensidad de sus efectos conductuales e histológicos. Resultados similares en el modelo de la rata se han obtenido más recientemente por otros grupos independientes (Hao et al., 2002; Shukla et al., 2004). En este contexto, un primer estudio piloto en seis pacientes con EP ha demostrado que el autotrasplante estriatal bilateral de agregados celulares del cuerpo carotídeo es un procedimiento viable y capaz de inducir cambios clínicos objetivos, aunque de intensidad y duración variables (Arjona et al., 2003). A los seis meses del trasplante, cinco pacientes habían mejorado su puntuación en la escala UPDRS III en situación de apagado (evaluada de forma ciega mediante vídeo) en un 26-74%, y a los 12 meses en un 13-52%. El único paciente que no obtuvo mejoría clínica tenía un cuerpo carotídeo fibrótico, con escasos elementos celulares en el ulterior estudio histológico. En un paciente de este estudio, la implantación sólo se completó satisfactoriamente en el estriado derecho, aunque recibió trayectos quirúrgicos bilaterales: únicamente el hemicuerpo izquierdo, más afectado por la enfermedad, mostró una mejoría motora significativa en las evaluaciones doble ciego. Hay que tener en cuenta que ni el paciente ni los evaluadores conocían la asimetría en la implantación (Arjona et al., 2003). Este caso sugiere que la mejoría clínica se relaciona en su mayor parte con los efectos biológicos de las células implantadas, ya que difícilmente podría atribuirse al denominado 'sesgo del evaluador', al efecto placebo, o a los efectos inespecíficos de la lesión quirúrgica. Al igual que otras variables, los principales factores pronósticos asociados con una evolución motora más favorable fueron: la mayor integridad histológica del cuerpo carotídeo (evaluada de forma ciega tras el estudio de una pequeña porción periférica) y la menor edad de los pacientes (Arjona et al., 2003). Aunque no se dispone de un grupo control, este análisis también apoya la existencia de un auténtico efecto biológico inducido por el trasplante. Es interesante destacar que ninguno de los pacientes desarrolló discinesias en

situación de apagado como las descritas en los estudios controlados sobre trasplantes de mesencéfalo fetal (Arjona et al., 2003).

Este hecho está en consonancia con la hipótesis de que los trasplantes no restaurarían de forma directa la función dopaminérgica estriatal, sino que su mecanismo de acción estaría mediado principalmente por factores neurotróficos. En este sentido, mientras que en los estudios sobre mesencéfalo fetal se han trasplantado millones de células a cada paciente, el número de células glómicas implantadas en este estudio ha sido mucho menor, del orden de decenas de miles (Arjona et al., 2003).

Aunque las perspectivas de estos trasplantes son prometedoras debido a su mecanismo de acción, en la actualidad no se han definido suficientemente las principales variables metodológicas como para plantear la realización de un ensayo clínico controlado (fase III). Previamente, sería necesario definir los candidatos más idóneos, establecer el origen y número óptimo de células glómicas, y perfeccionar los procedimientos técnicos relacionados con el procesamiento celular y la implantación.

Se han realizado estudios donde se han implantado otros tipos celulares como de Ganglio cervical superior, paraganglio de Zuckerkandl, células testiculares de Sertoli, células PC12, con resultados interesantes, sin embargo, es necesario explorar más estas técnicas (Mínguez-Castellanos y Escamilla-Sevilla, 2005)

Trasplante de células modificadas genéticamente

(Terapia génica ex vivo)

Una de las líneas más prometedoras dentro de la terapia celular es la posibilidad de modificar genéticamente diferentes estirpes celulares antes de trasplantarse. De esta forma se podrían obtener células que ejercieran funciones predeterminadas en el cerebro huésped, como liberar diferentes neurotransmisores o factores neurotróficos. También podría modificarse la expresión de los antígenos de histocompatibilidad para evitar el rechazo inmunológico, en el caso de que las células provengan de otro individuo o especie. Las células ideales deberían poder cultivarse y expandirse fácilmente, así como sobrevivir e integrarse bien en el cerebro huésped.

En modelos animales de EP se ha ensayado el trasplante de distintas células modificadas genéticamente, sobre todo: fibroblastos, astrocitos, células de la médula ósea, líneas celulares inmortalizadas y células troncales (Mínguez-Castellanos y Escamilla-Sevilla, 2005). La terapia génica *ex vivo* presenta ventajas considerables con relación a la terapia *in vivo*, sobre todo si se considera la posibilidad de usar esta estrategia como una opción en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en humanos, ya que nos permite mantener el control de la transferencia génica antes del proceso de implantación celular

Trasplante de células madre

Las células madre o troncales son células indiferenciadas con capacidad para autorrenovarse y transformarse en diferentes tipos celulares especializados, por lo que una de sus posibles aplicaciones es la medicina regenerativa. Se han investigado células precursoras de distintos orígenes:

Células madre embrionarias

Se obtienen de la masa celular interna del blastocisto preimplantatorio (4-5 días postconcepción), son pluripotenciales (pueden dar lugar a cualquier tipo celular del adulto) y poseen una elevada capacidad de autorrenovación. Se ha demostrado que pueden diferenciarse en células dopaminérgicas in vivo tras trasplantarse en roedores (Deacon et al., 1998; Björklund et al., 2002), aunque con la posibilidad de producir teratomas (Björklund et al., 2002). También se ha conseguido inducir el fenotipo dopaminérgico in vitro con la utilización de diferentes señales (como la proteína *sonic hedgehog*, FGF8, o los factores de transcripción Nurr-1 o Pitx-3) (Arenas., 2002). Estas células diferenciadas in vitro, procedentes de embriones de ratón (Kim et al., 2002) o de primates (Kawasaki et al., 2002; Takagi et al., 2005), pueden sobrevivir e integrarse funcionalmente en el estriado de la rata con lesión por 6-OHDA (Kim et al., 2002; Kawasaki et al., 2002) y del primate tratado con MPTP (Takagi et al., 2005). Sin embargo, el porcentaje de células que han sobrevivido en estos estudios es menor al 10%.

Células precursoras inmaduras

Son células neurales obtenidas del mesencéfalo embrionario de pocas semanas de desarrollo. Aunque ya han perdido potencialidad, todavía pueden expandirse y diferenciarse en neuronas dopaminérgicas. Estas células diferenciadas in vitro procedentes de embriones de rata pueden sobrevivir tras trasplantarse en el estriado de ratas hemiparkinsonicas, aunque con baja supervivencia (Studer et al., 1998; Carvey et al., 2001). También se ha conseguido diferenciar células precursoras mesencefálicas humanas en neuronas dopaminérgicas (Storch et al., 2001; Sánchez-Pernate et al., 2001). Sin embargo, aunque esta estrategia permitiría incrementar el número de células dopaminérgicas disponibles por cada embrión, no hay razones para suponer que la supervivencia y efectos clínicos tras el trasplante sean superiores a los obtenidos con el tejido mesencefálico fetal de 6-9 semanas de desarrollo.

Células troncales extraneurales del adulto

Son células que se mantienen indiferenciadas en distintos tejidos del organismo con el objetivo de contribuir a su mantenimiento y reparación, por lo que conservan la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse en células del mismo tejido donde residen (multipotencialidad). Se ha demostrado que, bajo determinadas circunstancias, también pueden dar lugar a células de tejidos distantes, mediante el proceso denominado transdiferenciación. Las células madre obtenidas de la médula ósea podrían poseer esta capacidad, y originar células neurales si reciben las señales adecuadas (Jiang et al., 2002; Walczak et al., 2004). Aunque estos procesos se identifican mejor en la actualidad, se desconoce si será posible obtener suficientes células funcionales a partir de células madre del adulto, ya que existen limitaciones derivadas de su difícil aislamiento y de su menor capacidad para expandirse y permanecer indiferenciadas en cultivo.

Este tipo de células troncales son de especial interés ya que se trata de un autotransplante, aproximación que evitaría una respuesta inmune. Como ejemplos de este tipo de células se encuentran las células de sangre de cordón umbilical que son hematopoyéticas y mesenquimatosas las cuales se utilizan para el tratamiento de leucemia, anemia aplásica y talasemia (Meyer et al., 2009). Otra fuente importante de células troncales extraneurales del adulto son las que se encuentran en la médula ósea que tiene células estromales o células troncales mesenquimatosas. Este tipo de células tienen la capacidad de proliferar y estudios recientes sugieren que pueden ser capaces de diferenciarse en células parecidas a las del sistema nervioso central y consecuentemente en neuronas funcionales incluyendo células productoras de DA (Meyer et al., 2009).

Células troncales neurales del adulto

También existen células madre en determinadas regiones del cerebro adulto, como la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado, implicadas en los procesos de neurogénesis (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002). Estas células pueden dar lugar a todos los tipos celulares del sistema nervioso y adoptan el fenotipo de la región donde se implantan.

Redmond y su grupo reportaron que tras el trasplante de células troncales neurales de adulto en el modelo de MPTP en primates, las células sobrevivieron, migraron y tuvieron un impacto funcional evaluado mediante un método cuantitativo. Un número pequeño de éstas células se diferenciaron a células inmuno-positivas para TH y o DAT, sugiriendo que el microambiente dentro y alrededor de la SNc del cerebro lesionado de

un adulto, permite el desarrollo del fenotipo dopaminérgico en respuesta a células progenitoras (Redmond et al., 2007).

Lie y sus colaboradores describieron una población de células progenitoras dividiéndose activamente en la sustancia negra adulta, las cuales in situ dan lugar a células gliales maduras nuevas, pero no a neuronas. Sin embargo, tras extraerlas de la SNc, estas células progenitoras inmediatamente adquirieron la capacidad para diferenciarse en neuronas. El trasplante de células progenitoras de la SNc en el hipocampo de un cerebro adulto, mostró que estas células también se diferencian en neuronas en condiciones in vivo. Estos resultados sugieren que las células troncales que residen en la SNc pueden diferenciarse en neuronas nuevas si se exponen a señales ambientales adecuadas. Este potencial de desarrollo de las células troncales neurales en la SN puede ser de gran utilidad para futuras estrategias de reposición celular endógena en la EP (Lie et al., 2002).

Factores neurotróficos

Los factores tróficos son moléculas, generalmente proteínas, producidas por diferentes tipos celulares, que regulan la biología celular tanto en tejidos embrionarios como adultos. Los que actúan sobre el sistema nervioso se denominan factores neurotróficos y, entre otras funciones, regulan la diferenciación y mantenimiento del fenotipo neuronal y la sinaptogénesis. Además, estos factores protegen a las neuronas ante determinadas situaciones patológicas como la muerte por apoptosis y la acción de diferentes tóxicos (Moris y Vega, 2003).

Las células dopaminérgicas nigroestriatales son sensibles tanto in vitro como in vivo a la acción de distintos factores neurotróficos, principalmente GDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), neurotrofina 4 (NF-4), factor de crecimiento análogo a insulina (IGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). De todos ellos, el GDNF parece ejercer una acción trófica más potente sobre esta población neuronal.

Tras el trabajo inicial de Lin et al, que demuestra que el GDNF protege a las neuronas nigrales embrionarias (Lin et al., 1993), numerosos estudios han demostrado la capacidad de este factor para prevenir la degeneración neuronal y restaurar la función dopaminérgica en modelos animales de EP (Hoffer et al., 1994; Tomac et al., 1995; Winkler et al., 1996; Gash et al., 1996). En la EP humana este factor neurotrófico es deficitario en las neuronas nigroestriatales, lo que parece relacionado con la patogenia de la enfermedad (Chauhan et al., 2001).

Basados en los buenos resultados obtenidos con modelos animales, se iniciaron ensayos clínicos usando GDNF en pacientes con EP. Sin embargo, los trabajos iniciales demostraron que la inyección intraventricular de GDNF no generaba una mejoría en las evaluaciones motoras y se presentaron efectos adversos como náusea, anorexia, vómito, pérdida de peso, hiponatremia, parestesias y manifestaciones psicóticas (Nutt et al., 2003; Kordower et al., 1999). Los investigadores consideraron que estos inesperados resultados podían deberse a una inapropiada técnica de administración, ya que se había observado que la infusión intraputamina de GDNF en primates no humanos de edad avanzada, generaba una mejoría en las evaluaciones motoras y en el metabolismo dopaminérgico sin la aparición de efectos adversos (Maswood et al., 2002). Gill y colaboradores reportaron resultados exitosos usando la infusión intraputamina de GDNF (Gill et al., 2003). La administración directa de GDNF en el putamen de cinco pacientes con EP les generó mejorías en la escala UPDRS en el estado de apagado después de un año, sin efectos adversos serios. Además las discinesias inducidas por fármacos se redujeron en un 64% y no se observaron en los estados de apagado durante la administración crónica de GDNF (Gill et al., 2003). Patel y su grupo continuaron la infusión de GDNF por 2 años y reportaron buenos resultados sin la presencia de efectos adversos (Patel et al., 2005). El mismo grupo demostró evidencia neuropatológica de que la infusión de GDNF por 43 meses provocó el brote de fibras dopaminérgicas en concordancia con recuperación funcional (Love et al., 2005).

Por todo ello, la administración de GDNF podría ser un valioso tratamiento neuroprotector y neurorestaurador en la EP.

Terapia génica in vivo

Una de las estrategias terapéuticas más prometedoras que se está desarrollando es la terapia génica, la cual se puede clasificar en terapia sintomática, protectora y restaurativa. La estrategia más empleada hasta el momento es la terapia génica sintomática, en la cual se implantan o modifican genéticamente in situ, células que sean capaces de sintetizar y liberar levodopa o DA por sí mismas (Freed, 2001). La terapia génica in vivo consiste en el tratamiento directo del cerebro con vectores que expresen determinados genes de interés terapéutico. Estos vectores pueden ser virales (adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple o lentivirus) o no virales (liposomas, o complejos ADN-proteínas) (García-Miniet et al., 2003). Mediante la inyección intraestriatal directa de virus atenuados se ha conseguido una adecuada transferencia génica en modelos animales de EP. Por este medio se ha logrado

incrementar la expresión estriatal de TH en ratas hemiparkinsonianas, con mejoría del déficit neuroquímico y motor (During et al., 1994, Leone et al., 2000). En este sentido, los mejores resultados se han obtenido mediante la triple transducción de TH, DAA y guanidil trifosfato (GTP) ciclohidrolasa I, las principales enzimas que intervienen en la síntesis de dopamina (Shen et al., 2000). En monos parkinsonianos, la transducción de DAA en el estriado por medio de un virus adeno-asociado es capaz de mejorar la respuesta al tratamiento con dosis bajas de levodopa (Bankiewicz et al., 2000).

Por otro lado se han realizado estudios en modelos animales de EP, principalmente en roedores, en los cuales se ha implantado material genético con la finalidad de sintetizar TH, que es la enzima limitante para la síntesis de DA. En dichos estudios se escogieron como blanco de la terapia génica a los astrocitos, los cuales son una plataforma versátil y cuentan con la maquinaria necesaria, con excepción de la TH, para la síntesis de DA. En estos estudios se observó una mejoría conductual significativa (Segovia et al., 1998, Trejo, et al., 1999) sin embargo es importante extrapolar estos resultados a pacientes humanos por lo que la experimentación en primates, por su mayor semejanza con el humano, es el siguiente paso.

2.2 Astrocitos

En la descripción inicial de las células gliales, en particular de los astrocitos, que son los más abundantes dentro de las células gliales, se redujo su función a ser el soporte para las neuronas, lo cual fue congruente con el hecho de que los astrocitos no son eléctricamente excitables. Aunque los astrocitos son capaces de expresar canales iónicos iguales a los que se expresan en neuronas, el nivel de expresión es relativamente bajo (Seifert y Steinhäuser, 2001).

Durante el último siglo, el conocimiento acerca del papel de los astrocitos se ha expandido de manera considerable, y ahora es bien sabido que los astrocitos juegan un papel crítico en el desarrollo y la fisiología del sistema nervioso central (SNC), estando involucrados en aspectos clave del funcionamiento neuronal, tales como soporte trófico y metabólico para neuronas, sobrevivencia y diferenciación neuronal, guía y sinaptogénesis (Kettenmann y Ransom, 2004). Se sabe que participan también en la homeostasis cerebral, en la regulación de la concentración local de iones y sustancias neuroactivas (Seifert et al., 2006). Contribuyen también en el control del flujo sanguíneo local del cerebro (Gordon et al., 2007).

Durante los últimos años, se ha recopilado considerable evidencia obtenida por varios laboratorios usando técnicas novedosas que indican que los astrocitos juegan un papel

activo en la función del cerebro como procesadores de información, basados en la demostración de que existe una comunicación recíproca entre astrocitos y neuronas.

Los astrocitos son capaces de censar la actividad neuronal como una señal de entrada, y realizar una integración no lineal para generar una señal de salida, por ejemplo la señal de Ca^{2+} que permite la liberación de un gliotransmisor, que es un neurotransmisor sintetizado y liberado por la glía, los más conocidos son glutamato y ATP.

La elevación de Ca^{2+} en los astrocitos puede ser espontánea (Peters et al., 2003) o puede ser disparada por diferentes estímulos incluyendo neurotransmisores liberados por neuronas (Perea y Araque, 2005).

Los astrocitos expresan una gran variedad de receptores, y la mayoría son metabotrópicos asociados a proteína G que estimulan la fosfolipasa C y la formación de inositol trifosfato, lo que aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular (Araque et al., 2002). Esta señal puede servir como señal intra e intercelular que puede propagarse entre los astrocitos y a otras células.

Finalmente, las elevaciones de Ca^{2+} pueden disparar la liberación de gliotransmisores, los cuales modulan la actividad neuronal, así como, la transmisión sináptica y plasticidad, mediante la comunicación bidireccional con las neuronas. Por lo anterior los astrocitos deben ser considerados como elementos celulares involucrados en el procesamiento de información en el SNC (Araque, 2008).

Por varias décadas, la gliosis reactiva que ocurre tras cualquier lesión al sistema nervioso central (SNC) se había considerado como uno de los mayores impedimentos para la regeneración axonal. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que, en tal condición, los astrocitos reactivos pueden proveer un sustrato que permita la regeneración axonal. Los astrocitos reactivos expresan en su superficie moléculas y producen varios factores neurotróficos y citocinas. La gliosis reactiva se caracteriza por la hipertrofia de los astrocitos así como, la proliferación de células microgliales, lo cual forma una barrera alrededor de la lesión aislándola para mantener el tejido del SNC aislado y protegerlo de una lesión secundaria. Del mismo modo los astrocitos reactivos están involucrados en la integración de tejido trasplantado al SNC y probablemente en la recuperación de la integridad de un área lesionada (Ridet et al., 1997).

En este trabajo hicimos grabaciones en video durante las diferentes fases experimentales. Dichas fases fueron antes y después del tratamiento con MPTP, durante la administración aguda de levodopa, se grabó también una línea base tras lavar la Levodopa/Carbidopa y finalmente después haber recibido la terapia génica. Las medidas subsecuentes se obtuvieron durante el análisis de las cintas y durante una evaluación clínica de las mismas usando la escala UPDRS modificada para la evaluación de primates.

3. PLANTEAMIENTO

La evaluación de terapias, en modelos de primates, requiere escalas clínicas que midan la conducta motora de manera adecuada. Para este propósito se han propuesto diversas escalas clínicas que miden la severidad de los síntomas extrapiramidales, así como los efectos de las diferentes terapias en primates no humanos. Sin embargo, este tipo de escalas no son objetivas ya que dependen del criterio del observador. Nosotros proponemos una escala cuantitativa basada en el uso de grabaciones en video para poder medir el desempeño motor de los sujetos antes de la intoxicación con MPTP, después de la intoxicación con MPTP y después de la terapia génica o del tratamiento farmacológico con levodopa.

Así mismo se propone el uso de astrocitos como blanco para terapia génica basados en las propiedades de estos ya que son una parte integral del tejido nervioso, tienen vida larga, son más resistentes al estrés oxidativo que las neuronas y poseen un sistema secretor eficiente.

4. OBJETIVOS GENERALES

Desarrollar un método eficiente y más objetivo para la evaluación del modelo de MPTP en primates no humanos, que sea útil para evaluar los cambios mediados por diferentes aproximaciones terapéuticas.

Utilizar a los astrocitos como blanco para la expresión de un plásmido con toda la región que codifica para la TH, como terapia génica para el tratamiento del parkinsonismo en el modelo de MPTP en monos verdes (*Cercopithecus aethiops*)

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar cuantitativamente las conductas motoras en primates no humanos antes y después de la aplicación de la neurotoxina (MPTP)
- Determinar si la transfección in vivo de cDNA que codifica para la TH resulta en la disminución de las deficiencias motoras causadas por el MPTP
- Comparar cuantitativamente las diferencias entre la mejoría obtenida con la terapia génica y la administración de levodopa a dosis de 15 mg/Kg.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales y métodos se describen con detalle en el artículo 2, en el cual desarrollamos una nueva metodología para evaluar el modelo de MPTP en primates no humanos, así como su tratamiento estándar con levodopa para probar la sensibilidad del método a los tratamientos.

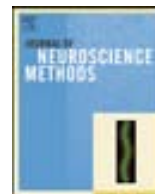
Artículo 2.

Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian primates in the HALLWAY task.

(J Neurosci Methods. 2009 Mar 15; 177(2): 361-8)

7. TERAPIA GÉNICA

Usando la metodología desarrollada por nuestro grupo para evaluar el desempeño motor de monos tratados con MPTP, probamos un tratamiento con terapia génica in vivo, mediante la transfección in vivo de astrocitos con un plásmido que los modifica genéticamente para que expresen el cDNA que contiene toda la región que codifica a la TH. Se sabe que a excepción de la TH, los astrocitos poseen toda la maquinaria bioquímica necesaria para sintetizar DA y liberarla al medio. La expresión de TH está regulada por el promotor del gen codificador para proteína ácida fibrilar glial (GFAP) La transfección del cDNA se realiza mediante lipofección. Aunque el DNA puede ser endocitado por cualquier célula, el promotor de GFAP permite la expresión de TH solo en los astrocitos.



Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian primates in the HALLWAY task

Aurelio Campos-Romo, Rafael Ojeda-Flores, Pablo Moreno-Briseño, Juan Fernandez-Ruiz*

Laboratorio de Neuropsicología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado. Postal No. 70-250, 04510 Cd. Universitaria, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2007
Received in revised form 17 October 2008
Accepted 17 October 2008

Keywords:

Parkinsonian syndrome
Primate model
Motor behavioral assessment
MPTP
Levodopa
Quantitative evaluation

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder. An experimental model of this disease is produced in nonhuman primates by the administration of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). In this work, we put forward a new quantitative evaluation method that uses video recordings to measure the displacement, gate, gross and fine motor performance of freely moving subjects. Four Vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) were trained in a behavioral observation hallway while being recorded with digital video cameras from four different angles. After MPTP intoxication the animals were tested without any drug and after 30 and 90 min of Levodopa/Carbidopa administration. Using a personal computer the following behaviors were measured and evaluated from the video recordings: displacement time across the hallway, reaching time towards rewards, ingestion time, number of attempts to obtain rewards, number of rewards obtained, and level of the highest shelf reached for rewards. Our results show that there was an overall behavioral deterioration after MPTP administration and an overall improvement after Levodopa/Carbidopa treatment. This demonstrates that the HALLWAY task is a sensitive and objective method that allows detailed behavioral evaluation of freely moving monkeys in the MPTP Parkinson's disease model.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD), described by James Parkinson in 1817, is one of the most common neurodegenerative disorders affecting approximately 1% of the population over 50 years old (Hoehn and Yahr, 1967; Adams et al., 1997). It is caused by a progressive degeneration of the dopaminergic neurons in the substantia nigra. There is a loss of the nigrostriatal pathway and therefore a decrease of dopamine (DA) levels at the striatum. PD's etiology is unknown. Nevertheless it has been reported that both genetics and environmental factors can be involved (Fuente-Fernandez and Calne, 2002; Le and Appel, 2004).

PD is characterized clinically by the classic triad composed by tremor, which is generally at rest; rigidity to passive movements; and bradykinesia, which is characterized by difficulty in initiating movements or executing sudden movements. Other symptoms are postural alterations, loss of facial expression, and altered balance and gait (Adams et al., 1997; DeLong, 2000). One of the most important experimental models of this disease is produced in nonhuman primates by the administration of the neurotoxin

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). It has been reported that intoxication with MPTP reproduces the histological injuries, as well as behavioural, biochemical and cognitive alterations characteristic of idiopathic PD in both, humans (Burns et al., 1985; Langston et al., 1983) and nonhuman primates (Burns et al., 1984; Di Paolo et al., 1986; Elsworth et al., 1989; Fernández Ruiz et al., 1995; Jenner et al., 1984; Langston et al., 1984). This model has been used to evaluate different antiparkinsonic therapies including pharmacological, surgical procedures, transplants and gene therapy (Fernandez-Ruiz et al., 1999; Hadj Tahar et al., 2004; Calon et al., 1999; Elsworth et al., 1998; Luquin et al., 1999; Eslamboli et al., 2005; Muramatsu et al., 2002). There are different pharmacological treatments to relieve Parkinson's disease symptoms; levodopa is the most often used nowadays. However, this drug causes adverse effects after a few years because of its complex pharmacokinetics and pharmacodynamics (Adams et al., 1997; DeLong, 2000). To study the effect of PD therapies, clinical scales that quantitatively measure the motor behaviour are needed. Diverse clinical scales have been used to evaluate the severity of the extrapyramidal signs, as well as the effects of the levodopa therapy in nonhuman primates (Imbert et al., 2000). Nevertheless, these kinds of scales are not entirely objective since the criteria and the experience of the observer are involved. Video analysis systems have also been designed to measure the activity of the subjects in their cage

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5623 2123.

E-mail address: jfr@servidor.unam.mx (J. Fernandez-Ruiz).

(Chassain et al., 2001; Moussaoui et al., 2000). However, there is not a single system that measures freely moving monkeys doing behavioural tasks that require their displacement. In models using rodents, a method has been used to evaluate quantitatively the gait using a behavioural hallway and measuring the time that the animal takes to cross it. In this method, the rodent is recorded using a videotape that is later analyzed. This method allows more objective evaluation of Parkinsonism rodent models (Muir and Whishaw, 1999).

In the present work we developed in a nonhuman primate model of Parkinson disease a method that allows us to quantify behaviours that are of great importance for PD patients, such as gait, feeding and thoracic limbs movements. The method consists of making video recordings of nonhuman primates while performing a behavioral task before and after MPTP administration, 30 and 90 min after the acute administration of Levodopa/Carbidopa as well as a no Levodopa/Carbidopa test between the two pharmacological treatments. The clinical measurements were obtained during the analysis of the tapes using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS).

2. Material and methods

2.1. Animals

Experiments were carried out with 2 female and 2 male vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*), weighing from 2.5 to 5.1 kg. Animals were kept under a controlled environment in individual cages, with light/dark cycles of 12:12 h, temperature of $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and $50 \pm 10\%$ relative humidity, with free access to water, fruits, vegetables and pellets (High Protein Monkey Chow of Lab Chows, Purina®). The animals were maintained in conditions according to the NOM-062-ZOO-1999: we followed the engineering specifications for the well-taken care of production and use of the laboratory animals as well as the regulations for animal care as prescribed in the Veterinary Medicine Faculty.

2.2. MPTP treatment

A room with all the necessary security and safety measures for the animals and the researchers was prepared and secured. The room had a designated red zone where individual cages were kept to house the monkeys during the injection protocol. A biological-infectious remains container was also kept in this area. There was also a black zone where the behavioral hallway apparatus and the cameras to make the videos were kept. Finally there was a gray zone where the personnel changed to disposable laboratory clothes. The personnel security protocols were made and followed according to (Przedborski et al., 2001).

Parkinsonism was produced following standard treatment (Taylor et al., 1997) with MPTP hydrochloride (Sigma, St Louis the USA) dissolved in saline solution. The monkeys were administered an accumulated dose from 2.0 to 2.5 mg/kg divided into 4–5 intramuscular doses of 0.5 mg/kg in a period of 4–5 days until they presented a stable extra-pyramidal syndrome (Taylor et al., 1997). After MPTP treatment, monkeys were closely monitored; they were provided with sufficient water and food to maintain their corporal weight and general well being.

2.3. Levodopa treatment

Once the behavioral evaluation following MPTP intoxication was finished, Levodopa/Carbidopa (Sinemet® Merck Sharp & Dohme de México S.A de C.V.) (15/1.5 mg/kg/day) was given orally every day. After 1 week, the pharmacological treatment was followed 30 min

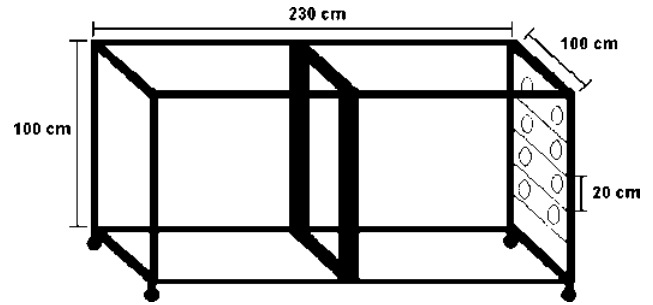


Fig. 1. Diagram of the HALLWAY apparatus for the behavioural evaluation made with a steel frame and transparent acrylic walls. At the end of the hallway there are 8 orifices divided in 4 shelves for taking the reward. See Section 2.4 for details.

later by behavioral evaluations for 10 days. In a second experiment using monkeys 2 and 3, the Levodopa/Carbidopa treatment was followed 90 min later by the behavioral evaluation.

2.4. Behavioural apparatus

For the behavioural evaluation, an apparatus made with a steel frame and transparent acrylic walls was used; the apparatus measures are 230 cm length, 100 cm high and 100 cm wide. At the end of the hallway there are 8 holes placed at 4 shelves, with one hole to the right and one to the left on each shelf. The first shelf is located 15 cm from the floor of the hallway; the second is 35 cm; the third is 54 cm; and, the fourth is placed 72 cm from the floor of the hallway. On the second level to the right side there is a well to evaluate fine movements (Fig. 1). The animal's performance in the apparatus is video recorded using digital camcorders from 4 different perspectives: a lateral view, a lateral zoom to the two first shelves, a frontal view and a frontal zoom (Fig. 2).

2.5. Task

Each monkey was transferred in a transport cage from its living facility to the hallway area where the transport cage could be connected to the behavioral hallway. The task consisted in walking through the hallway and reaching for two rewards that were initially placed on the first shelf, one on each side. The rewards were placed in front of the window to make it possible for them to be taken from the hole. Once the monkey had taken them, it had to return to the beginning of the hallway. When that happened, the rewards were placed on the second shelf; this process was repeated for the third and fourth shelves. When the monkey took the rewards from all four shelves, the process initiated again but the rewards were placed between the two holes in such a way that it was possible to reach only one reward through the right hole, and the other reward through the left one forcing the use of the right and left hands respectively. This process was repeated for the second, third and finally the fourth and highest shelf. To evaluate fine movements, 4 rewards were placed in a well located in the second shelf. In baseline conditions, each test ended as soon as the monkey reached for all the rewards, regardless of the total time it took him to do so. All behavioral tests after the MPTP treatment lasted a maximum of 10 min, regardless of the monkey's performance on each trial.

2.6. Behavioral evaluation

Monkeys were video recorded during all the executions of the HALLWAY task. The behavioral evaluations were made from those videos. Initially they were recorded for 10 days in baseline conditions before MPTP treatment (Baseline). After MPTP intoxication,

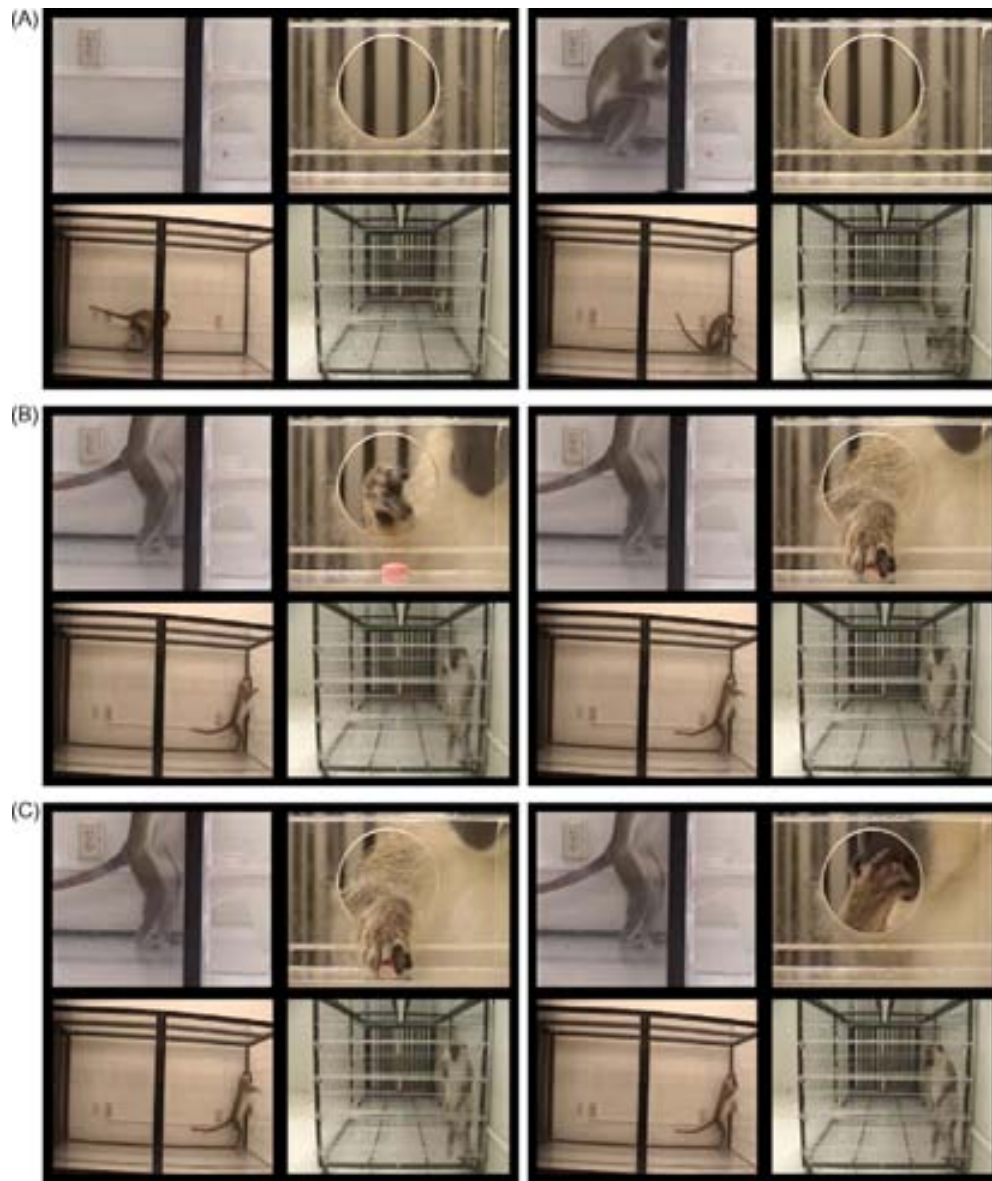


Fig. 2. Images compositions captured from each of the four cameras video recordings showing critical epochs in the quantification of different behaviors. (A) Displacement time across the hallway is taken from the moment the monkey crossed the line in the middle of the hallway (left composition) until any part of its body touched the end of the hallway or stopped in the horizontal direction (right composition). (B) The reaching time towards the rewards is considered from the moment the monkey's hand passes through the window at the end of the hallway (left composition) until it takes the reward (right composition). (C) The ingestion time is calculated from the moment the monkey holds the reward firmly (left composition) until it puts the reward in its mouth (right composition).

there was a 1 month Parkinsonism stabilization period before the monkeys were evaluated again for 10 days (MPTP). Then, monkeys were assessed for another 10 days, each time 30 min after Levodopa/Carbidopa treatment (Levodopa). Afterward, the treatment was stopped and monkeys (2, 3 and 4) were assessed ten days later for another 10 days (No Levodopa). Finally, two monkeys (monkeys 2 and 3) were assessed 90 min (1 Levodopa/Carbidopa Elimination half-life) after the administration of Levodopa/Carbidopa for another 10 days (Levodopa 2).

The digital recordings were exported to a PC. Using Adobe Premiere 6.0[®] software, the four different angle takes were synchronized, and then placed together in a composition fitting the screen using After Effects 5.5[®] software. The final projects were saved in Quick Time[®] format. The analysis of the videos consisted in frame by frame quantifications of displacement time across the hallway, reaching time towards the rewards, ingestion time, num-

ber of attempts to obtain rewards, number of rewards obtained, and the highest shelf level reached to for rewards (Fig. 2).

2.7. Clinical evaluation

The clinical evaluation was done using the same videos of the behavioral evaluation. We assessed the monkey's behavior with the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) which rates: face expression (0–4), action tremor (0–4), rest tremor (0–4), posture (0–4), gait (0–4) and bradykinesia (0–4). Evaluations were carried out during 10 days in each of the following conditions: baseline, one month after finishing the MPTP administration, 30 min after the administration of Levodopa/Carbidopa, ten days after withdrawing the Levodopa/Carbidopa treatment (monkeys 2, 3 and 4), and finally 90 min after the administration of Levodopa/Carbidopa (monkeys 2 and 3).

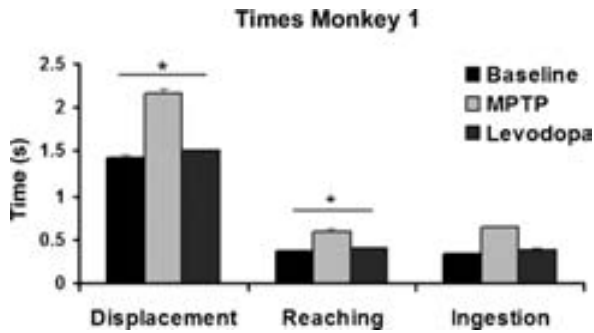


Fig. 3. Average amount of time (in seconds: s) at baseline (Baseline), after the administration of MPTP (MPTP) and 30 min after the treatment with Levodopa/Carbidopa (Levodopa). Taken by monkey 1 to perform the 3 different components of the HALLWAY test. Bars represent the standard error of the mean. * No significance. The other comparisons are $P < 0.0001$ (ANOVA for repeated measures with post hoc Bonferroni test).

2.8. Statistical analysis

Intra-individual comparisons were made using a two-way ANOVA for repeated measures (RM ANOVA) followed by post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons ($P < 0.05$).

Greenhouse–Geisser corrections to adjust degrees of freedom were done in instances where the null hypotheses of sphericity test were rejected. Analyses were made for each subject set of data. The analysis included data obtained from the baseline condition, data obtained after the MPTP administration, during treatment with Levodopa/Carbidopa, data without any treatment and data from the assessments 90 min after the administration of Levodopa/Carbidopa.

The clinical rating scale was calculated by averaging the scores from three different evaluators who did not know the experimental conditions of the videos they were analyzing. Therefore, for each condition the evaluators saw 10 videos corresponding each to one day.

To analyze the correlation between the UPDRS and HALLWAY measures a Spearman's rank correlation coefficient was used. It should be noted that this correlation was chosen over the Pearson product moment correlation because the Spearman's rank correlation does not make any assumptions about the frequency distribution of the variables.

3. Results

The RM ANOVA for monkey 1's data showed that there were significant differences in the displacement time for crossing the hallway (Greenhouse–Geisser correction $F = 142.616$, $df = 1.739$, $P < 0.0001$). The Bonferroni post hoc analysis showed that the differences were between the MPTP condition and the other two conditions ($P < 0.0001$ for both comparisons). However, there were no differences between the baseline and the Levodopa/Carbidopa treatment ($P = 0.218$). This same pattern was repeated for the reaching time toward rewards (Greenhouse–Geisser correction $F = 36.563$, $df = 1.757$, $P < 0.0001$) where again, the Bonferroni post hoc analysis showed that the differences were between the MPTP conditions and the other two conditions ($P < 0.0001$ for both comparisons), but not between the baseline and the Levodopa/Carbidopa treatment ($P = .319$). However for the ingestion time, RM ANOVA shows significant differences (Greenhouse–Geisser correction $F = 182.012$, $df = 1.573$, $P < 0.0001$), and, in contrast with the other two behaviours, the Bonferroni post hoc analysis showed also differences between baseline condition and Levodopa/Carbidopa treatment ($P < 0.001$) (Fig. 3).

The RM ANOVA for Monkey's 2 data showed that there were significant differences in the displacement time for crossing the hallway (Greenhouse–Geisser correction $F = 52.935$, $df = 1.907$, $P < 0.0001$). The Bonferroni post hoc analysis showed that all conditions were different from each other ($P < 0.0001$), except between the Levodopa/Carbidopa conditions where no significant differences ($P = 1.000$) were found. For the reaching time toward rewards there were significant differences (Greenhouse–Geisser correction $F = 42.305$, $df = 1.090$, $P < 0.0001$). The Bonferroni post hoc analysis showed that the MPTP and the No Levodopa condition after MPTP were different ($P < 0.001$) from all conditions. The other conditions showed no differences between them ($P = 1.000$). For the ingestion time there were significant differences (Greenhouse–Geisser correction $F = 65.928$, $df = 2.083$, $P < 0.0001$), where the Bonferroni post hoc analysis showed that the differences were between the MPTP condition and the other conditions ($P < 0.0001$ for all comparisons). There were also differences between No Levodopa/Carbidopa and the other conditions ($P < 0.05$ for all comparisons) except with Levodopa/Carbidopa 2 that although did not reach our criteria for significance, it showed a trend ($P < .075$). The Levodopa/Carbidopa 2 condition was in between the Levodopa/Carbidopa and the No Levodopa/Carbidopa groups since it did not show significant differences with any of them ($P > 0.07$) (Fig. 4).

The RM ANOVA for Monkey's 3 data showed that there were significant differences in the displacement time for crossing the hallway (Greenhouse–Geisser correction $F = 88.415$, $df = 3.276$, $P < 0.0001$). The Bonferroni post hoc analysis showed that the differences were between the Levodopa/Carbidopa ($P < 0.0001$) and no Levodopa/Carbidopa with all the other conditions ($P < 0.0001$). The rest of the conditions did not show significant differences between them ($P = 1.000$). The reaching toward rewards time showed significant differences (Greenhouse–Geisser correction $F = 60.898$, $df = 2.764$, $P < 0.0001$) where, the Bonferroni post hoc analysis showed that all the times were different with each other ($P < 0.0001$) except between the baseline time and Levodopa/Carbidopa 2 where there were no significant differences ($P = 1.000$). For the ingestion time, RM ANOVA shows significant differences (Greenhouse–Geisser correction $F = 56.224$, $df = 2.594$, $P < 0.0001$) The Bonferroni post hoc analysis showed significant differences between all times with each other ($P > 0.01$) except between basal condition with Levodopa/Carbidopa ($P = 1.000$), between baseline condition with Levodopa/Carbidopa 2 ($P = 0.772$) and between No Levodopa/Carbidopa with Levodopa/Carbidopa 2 ($P = 0.914$) (Fig. 5).

The RM ANOVA for Monkey's 4 data showed that there were significant differences in the displacement time for crossing the hallway (Greenhouse–Geisser correction $F = 15.820$, $df = 1.985$, $P < 0.0001$). The Bonferroni post hoc analysis showed that there were differences between all times with each other ($P < 0.0001$), except between baseline condition and Levodopa/Carbidopa ($P = 1.000$) and between MPTP condition and no Levodopa/Carbidopa ($P = 1.000$). The reaching time toward rewards showed significant differences (Greenhouse–Geisser correction $F = 47.355$, $df = 2.035$, $P < 0.0001$). The Bonferroni post hoc analysis indicated that there were differences between all times with each other ($P > 0.001$) except between baseline condition and Levodopa/Carbidopa ($P = 0.070$). For the ingestion time there were significant differences (Greenhouse–Geisser correction $F = 40.498$, $df = 1.914$, $P < 0.0001$). The Bonferroni post hoc analysis showed that there were differences between all times with each other ($P > 0.001$) except between baseline condition and Levodopa/Carbidopa ($P = 0.809$) (Fig. 6).

The percent average of the four monkeys with respect to their basal performance is shown in Fig. 7. Data of the

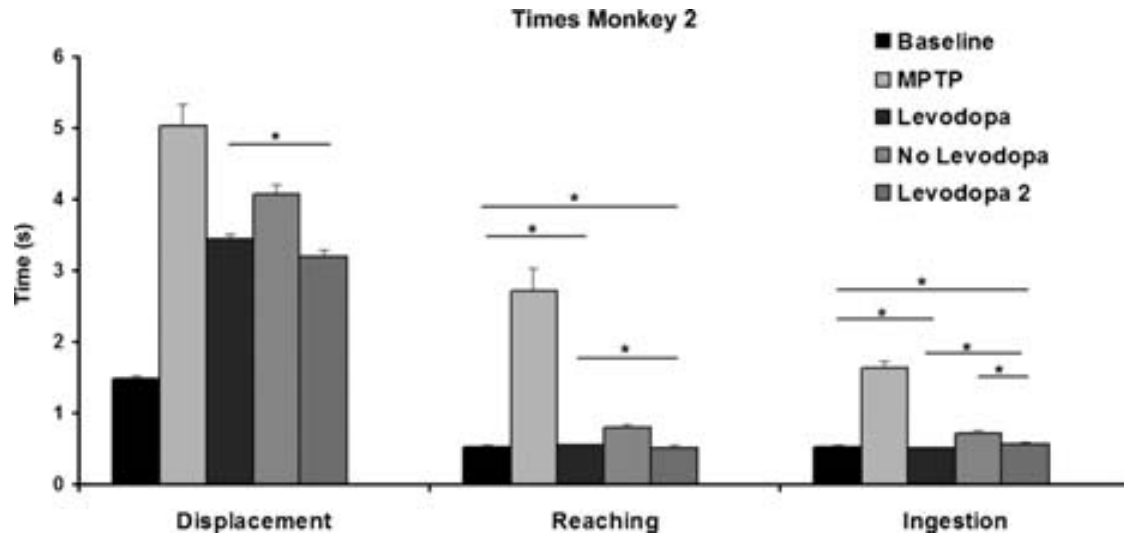


Fig. 4. Average amount of time (in seconds: s) at baseline (Baseline), after MPTP administration (MPTP), 30 min after Levodopa/Carbidopa administration (Levodopa), without pharmacological treatment (No Levodopa), and 90 min after Levodopa/Carbidopa treatment (Levodopa 2). Taken by monkey 2 to perform the 3 different components of the HALLWAY test. Bars represent the standard error of the mean. * No Significance. The other comparisons are $P > 0.05$ (ANOVA for repeated measures with post hoc Bonferroni test).

number of rewards obtained, number of attempts and the highest shelves in the different conditions are detailed in Table 1.

3.1. Clinical evaluation

The UPDRS clinical evaluation results can be seen in Table 2. The results show a clear deterioration of each and every one of the four monkeys after the MPTP administration (mean UPDRS 13.25 ± 1.19 s.e.m.). In contrast, the levodopa/carbidopa administration had a positive effect on the UPDRS (mean 6.24 ± 0.86 s.e.m.) showing a clear difference from the MPTP measures. Withdrawing of the levodopa/carbidopa led to another increase of the UPDRS score (mean 11 ± 0.57 s.e.m.). Finally, testing the UPDRS 90 min after a final dose of Levodopa/Carbidopa resulted once

again in an UPDRS decrease similar to the previous one (mean 7 ± 1 s.e.m.).

The results of the Spearman correlation analyses showed that there were no correlations between the UPDRS scores and the number of rewards, number of attempts, or the maximum shelf scores. However, the same analyses show significant correlations between the UPDRS and displacement ($r_s = 0.530$, $P < 0.03$), reaching ($r_s = 0.591$, $P < 0.02$) and ingestion times ($r_s = 0.609$, $P = 0.01$). The analyses of the individual components of the UPDRS showed that the only component that does not show correlations with the three HALLWAY time tasks was the action tremor (SEE Table 3). Although, the bradykinesia component of the UPDRS only showed correlation trends ($P = 0.06$) with the reaching and ingestion HALLWAY measures, it show a strong correlation with the displacement component ($P = 0.02$).

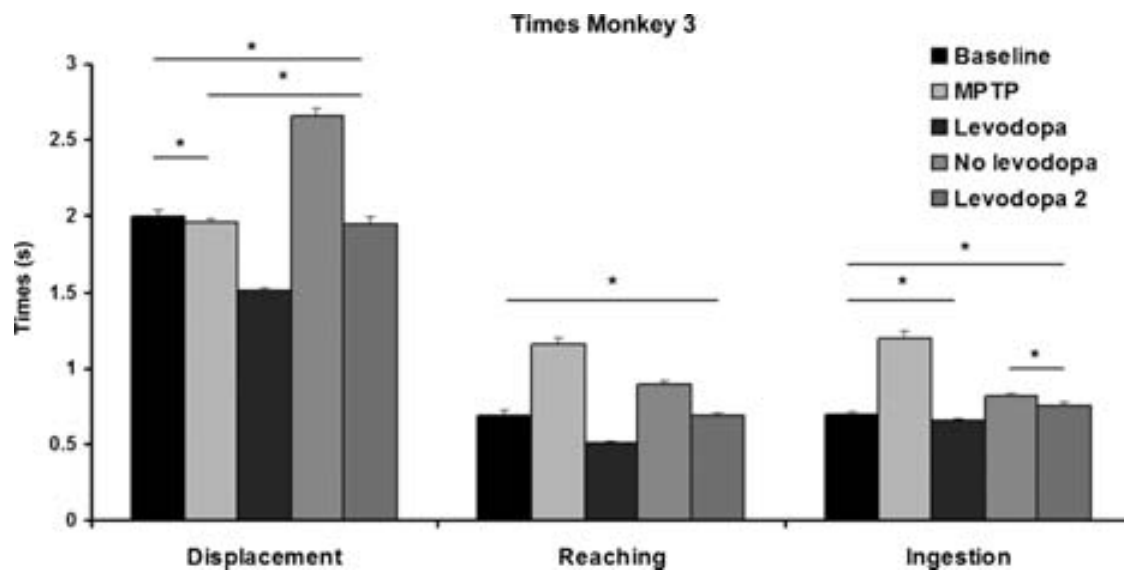


Fig. 5. Average amount of time (in seconds: s) at baseline (Baseline), after the administration of MPTP (MPTP), 30 min after the treatment with Levodopa/Carbidopa (Levodopa), without any treatment (No Levodopa) and 90 min after treatment with Levodopa/Carbidopa (Levodopa 2). Taken by monkey 3 to perform the 3 different components of the HALLWAY test. Bars represent the standard error of the mean. * No significance. The other comparisons are $P > 0.0001$ (ANOVA for repeated measures with post hoc Bonferroni test).

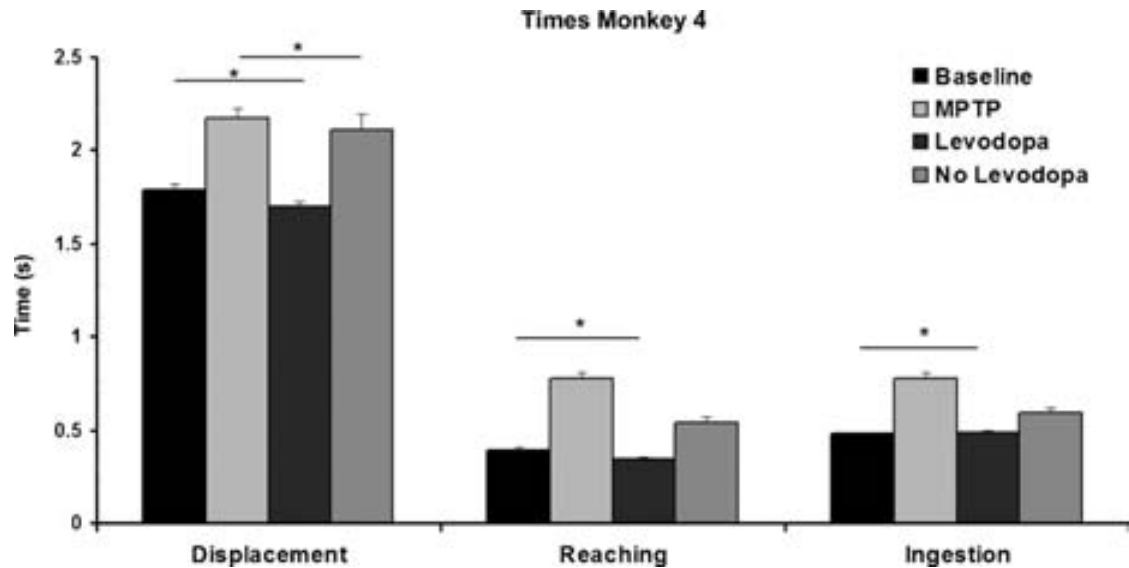


Fig. 6. Average amount of time (in seconds: s) at baseline (Baseline), after the administration of MPTP (MPTP), 30 min after the treatment with Levodopa/Carbidopa (Levodopa), and without any treatment (No Levodopa). Taken by monkey 4 to perform the 3 different components of the HALLWAY test. Bars represent the standard error of the mean. * No significance. The other comparisons are $P > 0.0001$ (ANOVA for repeated measures with post hoc Bonferroni test).

4. Discussion

These results show that it is possible to obtain quantitative measures of specific behaviors in freely moving monkeys using digital video recordings and a personal computer in the HALLWAY task. The task is sensible to changes due to the administration of MPTP, and to the therapeutic effect produced by the administration of Levodopa/Carbidopa. The HALLWAY task allows the separation and quantification of specific behaviors, like whole body translation, hand reaching, and feeding, behaviors that are impossible to evaluate using other automatic systems, or that depend on the subjective criteria of long trained observers. Furthermore, using this video system it was possible to quantify naturalistic behaviors that are more similar to those that affect humans with PD in their everyday life.

This method allows the measurement of each individual monkey's performance. This is important since each monkey can carry out each task in its own way, e.g. some monkeys are more passive, while others are more activity prone. Although analyses showed individual differences in baseline times among the animals, after MPTP administration all performing times increased significantly. This was true except for the displacement time of monkey 3 which showed prominent bradykinesia at the beginning of the trials, but once the movement was started, the mon-

key kept moving faster, probably by the same inertia that kept it still at the beginning of the trial. Once the pharmacological treatment was administered the animals took less time to cross the hallway. This suggests that the HALLWAY task is sensible to behavioral performance changes due to the treatment with Levodopa/Carbidopa. This became evident again after the treatment was withdrawn and the performance declined once more. In order to demonstrate the HALLWAY task sensitivity to pharmacological treatments, two monkeys were tested 90 min after the Levodopa/Carbidopa administration, i.e. the Levodopa/Carbidopa elimination half-life. The results showed that, on average, the performance was still better than that observed in the MPTP condition, but below the performance obtained 30 min after the administration of Levodopa/Carbidopa. The HALLWAY task sensitivity to different plasmatic concentrations of Levodopa/Carbidopa was most evident in monkey 3. In all cases, however, we found that when the treatment was stopped (No levodopa) the performance deteriorated, although not to the levels of the initial MPTP condition. A possible explanation for this effect could be related to the behavioral improvements that have been seen in MPTP-treated sham-operated and un-operated monkeys (Taylor et al., 1995), or simply that monkeys can acquire some expertise for performing the task, therefore doing it more efficiently.

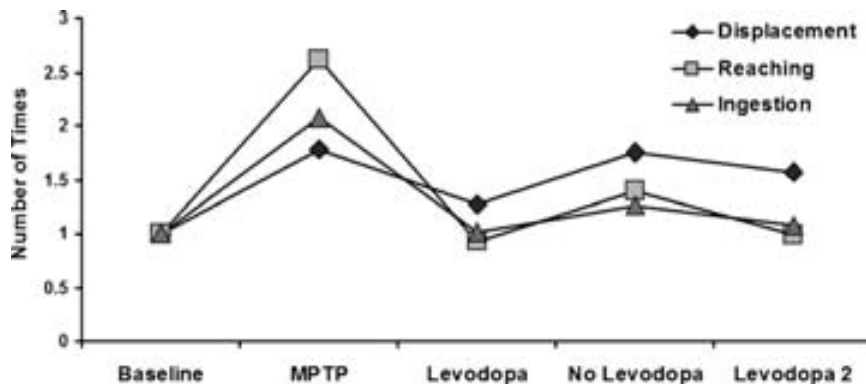


Fig. 7. Variation from the baseline of the four monkeys' average in three tasks during baseline (Baseline), after MPTP administration (MPTP), 30 min after Levodopa/Carbidopa treatment (Levodopa), without treatment (No Levodopa), and 90 min after the administration of Levodopa/Carbidopa (Levodopa 2).

Table 1

Comparison of the number of rewards, number of attempts, and maximum shelf scores of each monkey obtained during the baseline (Baseline), after MPTP treatment (MPTP), 30 min after Levodopa/Carbidopa treatment (Levodopa), without treatment (No Levodopa), and 90 min after the administration of Levodopa/Carbidopa (Levodopa 2).

	Number of rewards	Number of attempts	Maximum shelf
Monkey 1			
Baseline	160/160	1.13 ± 0.07	4
MPTP	153/160	1.11 ± 0.06	4
Levodopa	158/160	1.11 ± 0.131	4
Monkey 2			
Baseline	160/160	1.05 ± 0.05	4
MPTP	63/160	1.76 ± 0.59	3
Levodopa	122/160	1.09 ± 0.08	4
No levodopa	117/160	1.04 ± 0.05	4
Levodopa 2	113/160	1.02 ± 0.04	4
Monkey 3			
Baseline	160/160	1.12 ± 0.09	4
MPTP	155/160	1.17 ± 0.10	4
Levodopa	160/160	1.12 ± 0.05	4
No levodopa	160/160	1.13 ± 0.06	4
Levodopa 2	160/160	1.12 ± 0.06	4
Monkey 4			
Baseline	160/160	1.17 ± 0.08	4
MPTP	157/157	1.07 ± 0.04	4
Levodopa	160/160	1.11 ± 0.04	4
No levodopa	146/160	1.07 ± 0.06	4

The correlations between the UPDRS and the HALLWAY task scores suggest that although both are affected by similar factors (i.e. lack of dopamine or Levodopa/Carbidopa administration), there are differences in the behavioral aspects they measure. For example, while resting tremor and gait showed significant correlations with the displacement, reaching, and ingestion times measured in the HALLWAY task, those three behaviors did not show correlations with the action tremor component of the UPDRS score.

Other systems have been used to measure locomotor activity in parkinsonian nonhuman primates (Barcia et al., 2004; Gerber et al., 2000; Horii et al., 2002; Robinson et al., 1993), demonstrating the usefulness of the telemetry system for evaluating the circadian activity under physiological conditions. Previous experiments performed in macaques used similar systems to measure temperature and circadian activity (Aureli et al., 1999; Mehlman et al., 2000; Chassain et al., 2001). They used a video system which was able to calculate in real time the quantity and quality of the movements in monkeys, during the locomotor activity session in their cages. They measured the activity of each animal, which could be separated into three states. The first state corresponded to inactivity of the animal; the second, to normal activity; and the third to hyperactivity. The video system they tested was able to quantify change in activity curve after administration of MPTP and following antiparkinsonian drug administration in monkeys injured by MPTP with sensitivity to change, especially for time spent in hyperactivity. They also could

Table 2

Individual monkey scores obtained during the baseline (Baseline), after MPTP treatment (MPTP), 30 min after Levodopa/Carbidopa treatment (Levodopa), without any treatment (No Levodopa) and 90 min after Levodopa/Carbidopa administration (Levodopa 2) using the UPDRS clinical scale.

	Facial expression (0–4)	Action tremor (0–4)	Rest tremor (0–4)	Posture (0–4)	Gait (0–4)	Bradikinesia (0–4)	Total
Monkey 1							
Baseline	0	0	0	0	0	0	0
MPTP	2	3	2	3	2	3	15
Levodopa	1	2	0	1	1	2	7
Monkey 2							
Baseline	0	0	0	0	0	0	0
MPTP	1	2	3	2	2	2	12
Levodopa	0	1	1	1	1	1	5
No Levodopa	1	2	2	2	1	2	10
Levodopa 2	0	1	1	1	1	2	6
Monkey 3							
Baseline	0	0	0	0	0	0	0
MPTP	2	2	3	2	1	1	11
Levodopa	1	1	0	1	1	1	5
No Levodopa	2	1	2	1	2	3	11
Levodopa 2	1	1	1	1	2	2	8
Monkey 4							
Baseline	0	0	0	0	0	0	0
MPTP	2	3	2	3	2	3	15
Levodopa	1	2	1	2	1	1	8
No Levodopa	2	2	1	2	2	3	12

The values are the averages of the scores made by three different observers using the video recordings of 10 days per each condition.

Table 3

Spearman rank correlation between the different behaviors of the UPDRS scale and the displacement, reaching and ingestion times from the HALLWAY task. ρ = correlation rho, p = probability associated.

Spearman rank order correlation	Facial expression	Action tremor	Rest tremor	Posture	Gait	Bradykinesia	Total
Displacement							
ρ	0.231039	0.399557	0.717794	0.493683	0.541035	0.558829	0.539668
p	0.2714	0.0892	0.0036	0.0394	0.0226	0.0214	0.0292
Reaching							
ρ	0.514811	0.358137	0.760401	0.437438	0.530546	0.446135	0.593463
p	0.03	0.1236	0.002	0.0644	0.025	0.0628	0.0168
Ingestion							
ρ	0.578513	0.371567	0.744412	0.482845	0.590806	0.448033	0.613884
p	0.016	0.1118	0.0026	0.0434	0.0136	0.0614	0.0132

The values in bold are the ones which are statistically significant.

quantify several specific behaviours of the monkeys usually only assessed by clinical rating scales, such as climbing, social interactions, eating and drinking behaviours.

Compared with those different methods, the HALLWAY task has several advantages. First, the set up is simple and easy to use; the system comprises 4 video cameras located in different sides of the hallway, and a PC to calculate the times the monkeys spend doing their task. Second, monkeys are evaluated doing a task designed for testing both gross and fine motor control, including translation from one point to another, and not just the activity of the monkey in its living cage. Third, it is possible to evaluate the motor activity that corresponds to the most impairing symptoms of PD patients like altered gait, difficulty in initiating movements or executing sudden movements, reaching and feeding.

In conclusion, the HALLWAY task presented here is a sensitive, objective, reproducible method to evaluate motor behavior of non-human primates with Parkinsonism, with or without therapies.

Acknowledgements

We thank Manuel Golzarri-Moreno and Maria Fernanda Mendez-Yañez for their technical assistance. We also thank Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and Doctorado en Ciencias Biomedicas. This work was supported by CONACYT 186041, CONACYT 41617-M, DGEP and UNAM-PAPIIT-IN213802.

References

- Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principios de Neurología. 6a edición. Mexico: McGraw Hill; 1997. p. 925–31.
- Aureli F, Preston SD, de Waal FB. Heart rate responses to social interactions in free-moving rhesus macaques (*Macaca mulatta*): a pilot study. *J Comp Psychol* 1999;113:59–65.
- Barcia C, De Pablos V, Bautista-Hernández V, Sanchez-Bahillo A, Fernández-Barreiro A, Poza M, et al. Measurement of motor disability in MPTP-treated macaques using a telemetry system for estimating circadian motor activity. *J Neurosci Methods* 2004 Mar 15;134(1):59–64.
- Burns RS, Kelly E, Reavill C, Jenner P, Marsden CD. Repeated administration of n-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurons. *Biochem Pharmacol* 1984;33:1747–52.
- Burns RS, LeWitt PA, Ebert MH, Pakkenberg H, Kopin IJ. The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency: parkinsonism by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med* 1985;312:1418–21.
- Calon F, Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet PJ, Bédard PJ, et al. Chronic D1 and D2 dopaminomimetic treatment of MPTP-denervated monkeys: effects on basal ganglia GABA_A/benzodiazepine receptor complex and GABA content. *Neurochem Int* 1999;35:81–91.
- Chassain C, Eschalié A, Durif F. Assessment of motor behavior using a video system and clinical rating scale in parkinsonian monkeys lesioned by MPTP. *J Neurosci Methods* 2001;111:9–16.
- DeLong MR, Kandel ER, Schartz JH, Jessell TM, editors. Principles of neural science. McGraw-Hill; 2000. p. 862–4.
- Di Paolo T, Bedard P, Daigle M, Boucher R. Long-term effects of MPTP on central and peripheral catecholamine and indoleamine concentrations in monkeys. *Brain Res* 1986;379:286–93.
- Elsworth JD, Deutch AY, Redmond Jr DE, Taylor JR, Sladek Jr JR, Roth RH. Symptomatic and asymptomatic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated primates: biochemical changes in striatal regions. *Neuroscience* 1989;33(2):323–31.
- Elsworth JD, Brittan MS, Taylor JR, Sladek Jr JR, Redmond Jr DE, Innis RB, et al. Upregulation of striatal D2 receptors in the MPTP-treated vervet monkey is reversed by grafts of fetal ventral mesencephalon: an autoradiographic study. *Brain Res* 1998;795:55–62.
- Eslamboli A, Georgievska B, Ridley RM, Baker HF, Muzyczka N, Burger C, et al. Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2005;25(4 (January)):769–77.
- Fernández Ruiz J, Doudet DJ, Aigner TG. Long term cognitive impairment in MPTP treated rhesus monkeys. *Neuroreport* 1995;7:102–4.
- Fernández-Ruiz J, Doudet D, Aigner TG. Spatial memory improvement by levodopa in parkinsonian MPTP-treated monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;147(1):104–7.
- Fuente-Fernandez R, Calne DB. Evidence for environmental causation of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2002;8:235–41.
- Gerber P, Schnell CR, Anzenberger G. Cardiovascular parameters telemetrically measured during pregnancy, parturition, and lactation in a common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Contemp Top Lab Anim Sci* 2000;39:14–7.
- Hadj Tahar A, Grégoire L, Darré A, Bélanger N, Meltzer L, Bédard PJ. Effect of a selective glutamate antagonist on L-dopa-induced dyskinesias in drug-naive parkinsonian monkeys. *Neurobiol Dis* 2004;15:171–6.
- Hoen HM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;17:427–42.
- Horii I, Kito G, Hamada T, Jikuzono T, Kobayashi K, Hashimoto K. Development of telemetry system in the common marmoset—cardiovascular effects of astemizole and nicardipine. *J Toxicol Sci* 2002;27:123–30.
- Imbert C, Bezaud E, Guitraud S, Boraud T, Gross CE. Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the Macaque monkey. *J Neurosci Methods* 2000;96:71–6.
- Jenner P, Rupniak NMJ, Rose J, Kelly E, Kilpatrick G, Lees A, et al. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci Lett* 1984;50:85–90.
- Langston JW, Ballard PA, Tetrud JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983;219:979–80.
- Langston JW, Forno LS, Robert CS, Irwin I. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res* 1984;292:390–4.
- Le W, Appel SH. Mutant genes responsible for Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:79–84.
- Luquin MR, Montoro RJ, Guillén J, Saldise L, Insausti R, Del Río J, et al. Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron* 1999;22 (April):743–50.
- Mehlman PT, Westergaard GC, Hoos BJ, Sallee FR, Marsh S, Suomi SJ, et al. CSF5-HIAA and nighttime activity in free-ranging primates. *Neuropsychopharmacology* 2000;22:210–8.
- Moussaoui S, Obinu MC, Daniel N, Reibaud M, Blanchard V, Imperato A. The antioxidant Ebselen prevents neurotoxicity and clinical symptoms in a primate model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2000;166:235–45.
- Muir GD, Whishaw IQ. Complete locomotor recovery following corticospinal tract lesions: measurement of ground reaction forces during overground locomotion in rats. *Behav Brain Res* 1999;103:45–53.
- Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, et al. Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* 2002 Feb 10;13(3):345–54.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, et al. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* 2001;76:1265–74.
- Robinson EL, Demaria-Pesce VH, Fuller CA. Circadian rhythms of thermoregulation in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Am J Physiol* 1993;265:781–5.
- Taylor JR, Elsworth JD, Sladek Jr JR, Collier TJ, Roth RH, Redmond Jr DE. Sham surgery does not ameliorate MPTP-induced behavioral deficits in monkeys. *Cell Transpl* 1995;4(1 (January–February)):13–26.
- Taylor JR, Elsworth JD, Roth RH, Sladek Jr JR, Redmond Jr DE. Severe long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops sabaes*). *Neuroscience* 1997;81:745–55.

A continuación presento el manuscrito del artículo que será enviado para su publicación, con la metodología y los resultados de la transfección del plásmido antes mencionado, en el modelo de MPTP en primates no humanos, evaluado mediante nuestro método cuantitativo.

Artículo 3.

Behavioral improvement in MPTP-treated nonhuman primates in the HALLWAY task after transfer of TH cDNA to astrocytes.

(Manuscrito)

Behavioral improvement in MPTP-treated nonhuman primates in the HALLWAY task after transfer of TH cDNA to astrocytes

Aurelio Campos-Romo¹; Rafael Ojeda-Flores¹; Pablo Moreno-Briseño¹; Paula Vergara²; José Segovia²; José D. Carrillo-Ruiz^{3,4}; Juan Fernandez-Ruiz^{1*}

¹ Laboratorio de Neuropsicología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México. ² Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, México ³ Unidad de Neurocirugía Funcional y Estereotaxia del Hospital General de México, SSA. ⁴ Laboratorio de Neurociencias y Psicofisiología, Escuela de Psicología, Universidad Anáhuac Norte.

Corresponding Author *. Juan Fernandez-Ruiz

Laboratorio de Neuropsicología

Departamento de Fisiología

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

Apartado. Postal No. 70-250,

04510 Cd. Universitaria, D.F.

México.

Phone (52) (55) 5623 2123

E-mail: jfr@servidor.unam.mx

Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative disease, resulting from deterioration of the substantia nigra which in turn leads to a decrease of dopamine levels in the striatum. Clinically the syndrome is characterized by motor alterations, and is treated with oral administration of levodopa. However this treatment typically loses efficacy over time and therefore new treatments that procure a steady long term supplement of dopamine are needed. Here we tested the expression of a tyrosine hydroxylase (TH) transgene in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treated primates own astrocytes. The transgene, whose expression of TH cDNA was controlled by a glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter, was injected into two MPTP treated primates. Monkeys were tested before and after MPTP administration, and after the gene therapy treatment on the HALLWAY behavioral task. Results showed both transgene expression and significant behavioral improvements in the hallway task after the TH cDNA transfer. This behavioral recovery observed in the primates whose astrocytes expressing rat TH, represent a successful therapeutic approach based on the use of a technique designed to express therapeutic molecules in the primate's brain.

Keywords: Parkinsonism, MPTP primate model, astrocytes, gene therapy, quantitative evaluation.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative and progressive pathology, caused by an imbalance in the basal ganglia circuit resulting from a large decrease in dopamine (DA) levels in the striatum. This decrease is caused by neuronal death in the substantia nigra (pars compacta). Clinically the syndrome is known as Parkinsonism, which is characterized by motor alterations such as rest tremor, rigidity to passive movements, difficulty in initiating as well as slow movements (akinesia and bradikinesia). Other symptoms include postural alterations, loss of facial expression, gait and balance alterations. PD etiology is unknown, however, it has been reported that both genetics and environmental factors are involved [1,2]. One of the most important models that reproduces the histological injuries, as well as behavioural, biochemical and cognitive alterations characteristic of idiopathic PD in both humans [3,4] and nonhuman primates [5,6,7,8,9,10] is the administration of the mitochondrial complex I inhibitor 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). This model has been used to evaluate different antiparkinsonian therapies including pharmacological, surgical procedures, transplants and gene therapy [11,12,13,14,15,16,17]. Diverse pharmacological treatments exist to improve the symptoms of PD. Currently; administration of levodopa is the most used, with extraordinary results at the beginning of the treatment. Nevertheless, between 75 and 80% of the patients with PD that have received high doses of levodopa over the course of 5 to 10 years, develop motor complications such as dyskinesias in combination with rigidity and tremor, short On-Off phenomena and drug-intolerance [18,19,20,21,22].

One of the more promising therapeutic strategies currently being developed is gene therapy, which can be classified as symptomatic, protective and restorative. Among those, the most used is the symptomatic strategy, in which cells are implanted or genetically modified *in situ*, to make them able to synthesize and release levodopa or DA [23]. Although neural death progresses during PD, neurons have been the target cells of choice for this strategy [24,25,26,27]. However some rodent studies have

shown that it is possible to modify glial cells, which are a versatile platform with enough biochemical machinery, except for TH, to produce and release DA into the medium [28,29]. Studies using glia as a platform for releasing DA have found significant behavioral improvements in rodent models [30,31]. An important step in implementing this therapy in humans is to evaluate the possibility in primates of modifying host astrocytes in order to express TH which leads to a behavioral improvement.

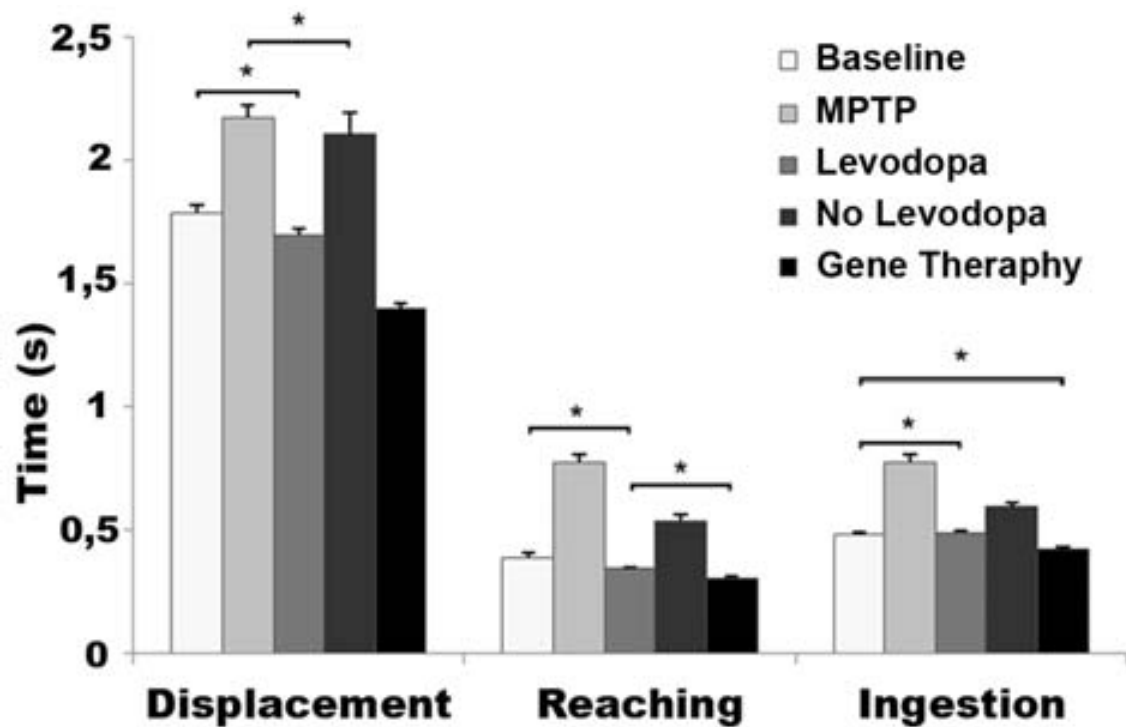
In this article we report the behavioral impairment observed in the HALLWAY task after MPTP treatment in vervet monkeys [32]. We also report the subsequent significant expression of TH and behavioral improvement following the injection of a transgene into the monkey's striatum. The TH cDNA of the injected transgene was designed to be under the glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter control.

2. Results

Experiments were carried out in 3 vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). Monkeys 1 and 2 received pGfa2-TH injections. Monkey 3 received pGfa2-cLac injections. They were evaluated using the hallway behavioral task [32]. Which measure displacement, reaching and ingestion times during the behavioral task (See Material and methods section).

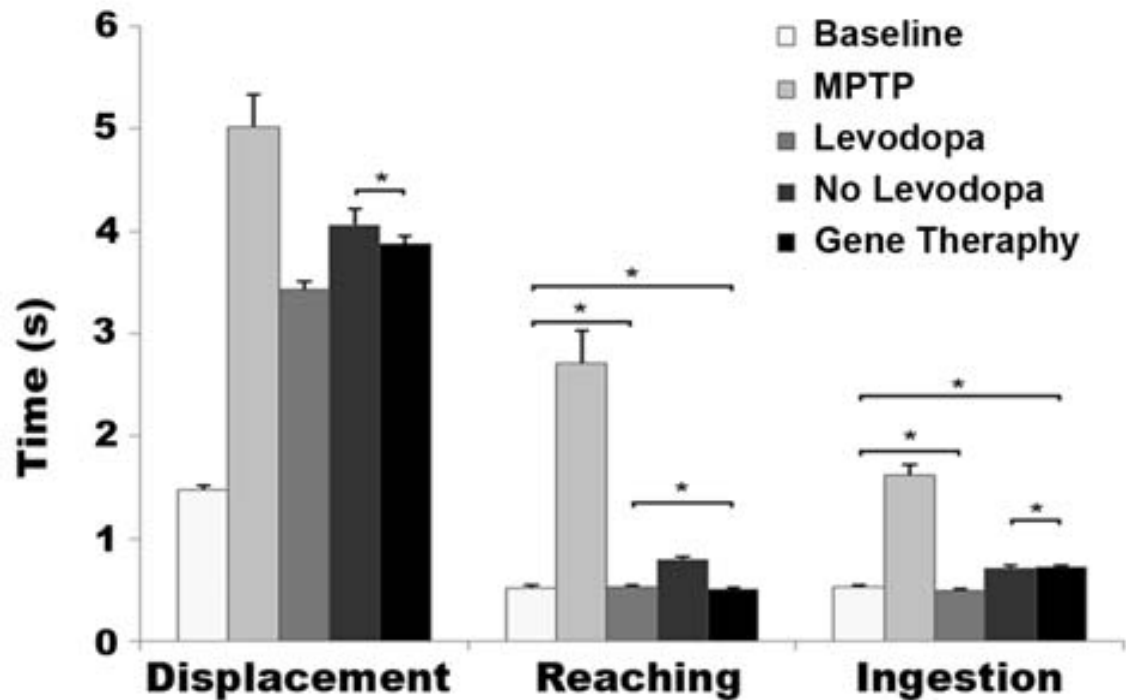
2.1 Behavioral evaluation

RM ANOVA for Monkey's 1 data showed that there were significant differences in displacement time for crossing the hallway across different conditions (Greenhouse-Geisser correction $F = 30.299$, $df = 2.246$, $p < 0.0001$). Bonferroni *post-hoc* analysis showed that there were time differences between all conditions ($p < 0.0001$), except between baseline condition and L/C ($p = 1.000$) and between MPTP condition and No L/C ($p = 1.000$). Reaching time toward rewards also showed significant differences between conditions (Greenhouse-Geisser correction $F = 57.261$, $df = 2.211$, $p < 0.0001$). Bonferroni *post-hoc* analysis indicated that there were time differences between all conditions ($p > 0.001$) except between baseline and L/C ($p=0.116$) and between L/C and after the gene therapy condition ($p= 0.085$). For ingestion time there were significant differences (Greenhouse-Geisser correction $F = 47.438$, $df = 2.293$, $p < 0.0001$). Bonferroni *post-hoc* analysis showed that there were time differences between all conditions ($p < 0.002$) except between baseline and L/C ($P = 1.000$) and between baseline and the after gene therapy condition ($p= 0.122$) (**Fig. 1**).



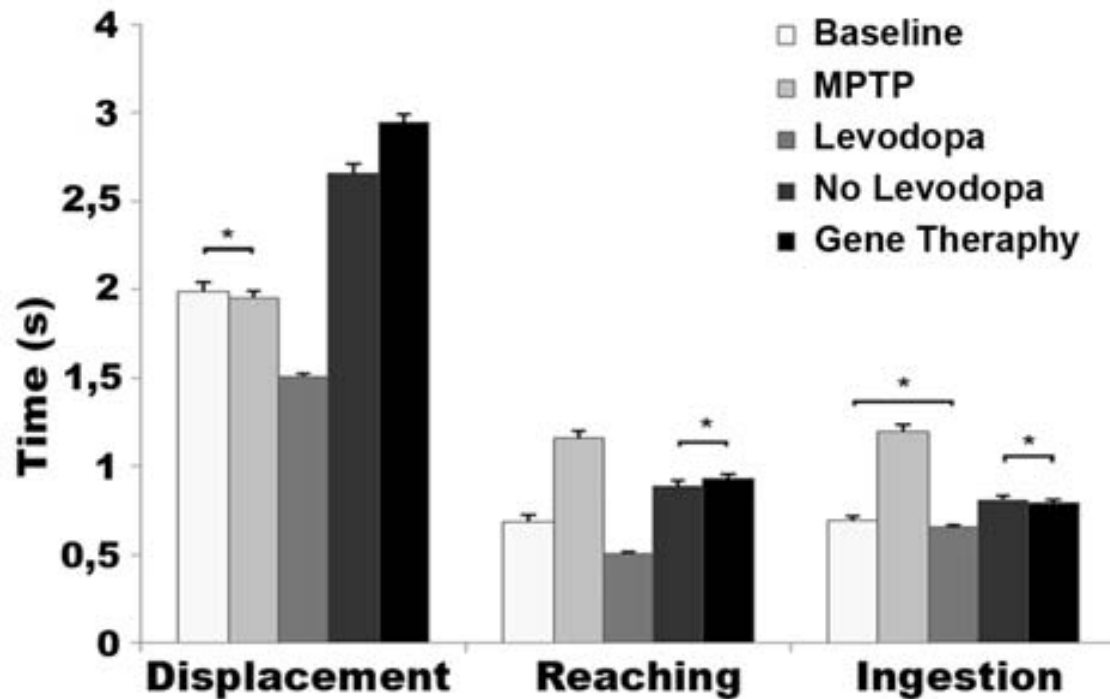
(Fig. 1) Monkey 1 (pGfa2-TH) behavioral data. Average amount of time in seconds (s), during displacement, reaching and ingestion at baseline (Baseline), after the administration of MPTP (MPTP), 30 minutes after the treatment with L/C (Levodopa), without any treatment (No Levodopa) and after gene therapy treatment (GT). Bars represent the standard error of the mean. * **No significant differences**. All other comparisons are $p < 0.0001$ (ANOVA for repeated measures with Bonferroni *post-hoc* test).

RM ANOVA for Monkey's 2 data showed a significant displacement time difference for crossing the hallway (Greenhouse-Geisser correction $F = 57.267$, $df = 1.953$, $p < 0.0001$). Bonferroni *post-hoc* analysis showed time differences between all conditions ($p < 0.0001$), except between the No Levodopa/Carbidopa and the after gene therapy condition ($p = 1.000$). For reaching time toward rewards there were also significant differences between conditions (Greenhouse-Geisser correction $F = 42.618$, $df = 1.088$, $p < 0.0001$). Bonferroni *post-hoc* analysis showed that the MPTP and No Levodopa conditions were different ($p < 0.001$) from the other groups. There were no other differences ($P = 1.000$). For ingestion time there were significant differences (Greenhouse-Geisser correction $F = 59.954$, $df = 2.204$, $p < 0.0001$). Bonferroni *post-hoc* analysis showed significant differences between all conditions, except between Baseline and L/C ($p = 1.000$) as well as between baseline and the after gene therapy condition ($p = 0.174$) and L/C and after gene therapy ($p = 1.000$) (Fig. 2).



(Fig. 2) Monkey 2 (pGfa2-TH) behavioral data. Average amount of time in seconds (s), during displacement, reaching and ingestion at baseline (Baseline), after the administration of MPTP (MPTP), 30 minutes after the treatment with L/C (Levodopa), without any treatment (No Levodopa) and after gene therapy treatment (GT). Bars represent the standard error of the mean. * No significant differences. All other comparisons are $p < 0.0001$ (ANOVA for repeated measures with Bonferroni *post-hoc* test).

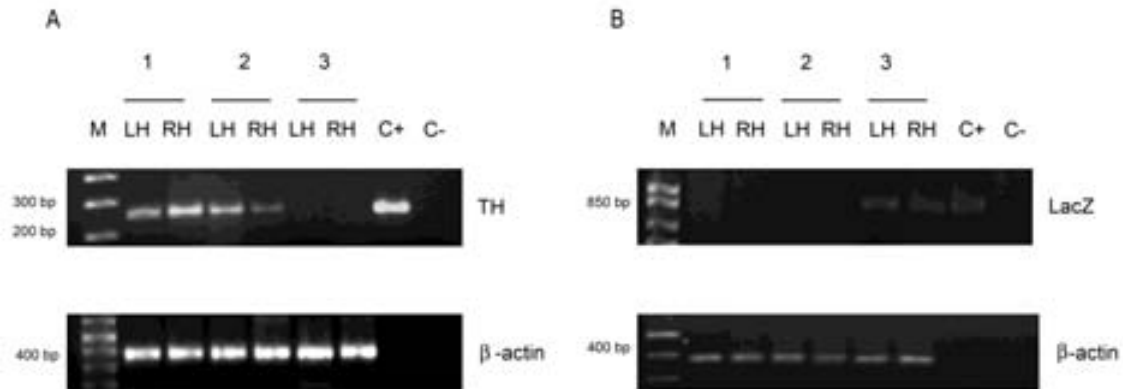
RM ANOVA for Monkey's 3 data showed again significant time differences between conditions for crossing the hallway (Greenhouse-Geisser correction $F = 166.719$, $df = 3.434$, $p < 0.0001$). Bonferroni *post-hoc* time analysis showed that all conditions were different from each other ($p < 0.0001$) except between baseline and MPTP ($p = 1.000$). Reaching toward rewards time showed significant differences (Greenhouse-Geisser correction $F = 60.451$, $df = 2.911$, $p < 0.0001$). Bonferroni *post-hoc* time analysis showed that all conditions were different between them ($p < 0.0001$) except L/C and gene therapy condition ($p = 1.000$). For ingestion time, RM ANOVA showed significant differences (Greenhouse-Geisser correction $F = 56.151$, $df = 2.469$, $p < 0.0001$) Bonferroni *post-hoc* analysis showed significant time differences between all conditions ($p > 0.03$) except between baseline and L/C ($p = 1.000$) and between no L/C and gene therapy ($p = 1.000$). (Fig. 3).



(Fig. 3) Monkey 3 (pGfa2-LacZ) behavioral data. Average amount of time in seconds (s), during displacement, reaching and ingestion at baseline (Baseline), after the administration of MPTP (MPTP), 30 minutes after the treatment with L/C (Levodopa), without any treatment (No Levodopa) and after gene therapy treatment (GT). Bars represent the standard error of the mean. * **No significant differences**. All other comparisons are $p < 0.0001$ (ANOVA for repeated measures with Bonferroni *post-hoc* test).

2.2 Vector expression

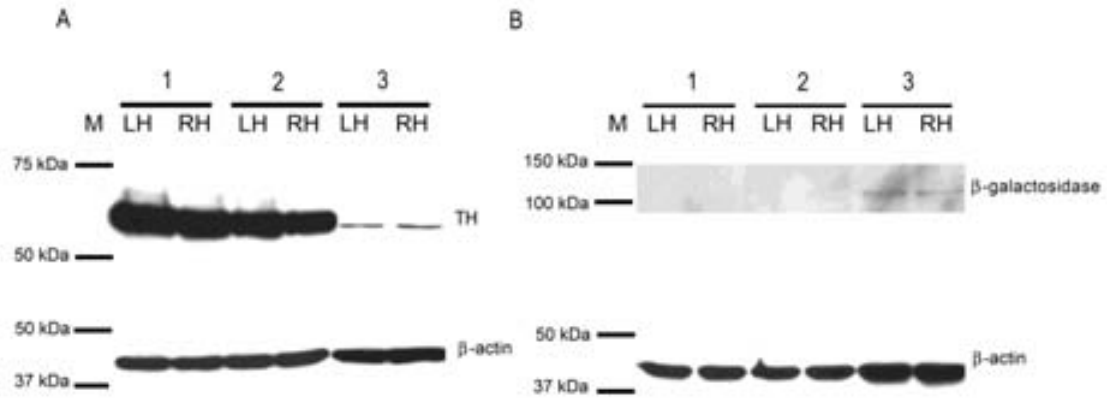
Transgene expression was determined through RT-PCR assays using oligonucleotides that specifically recognize TH rat sequences. **Fig. 4** shows TH transgene expression in the two monkeys that received the *gfa2-TH* plasmid, and the lack of TH expression in the monkey that received the pGfa2-LacZ plasmid. The RT-PCR product is of the expected size (258 bp), which is the same size as that obtained from the amplification of the pGfa2-TH control plasmid [33]. Restriction analysis of the amplicons with Apol resulted in two fragments of 98 and 160 bp, which correspond to the rat sequence. The control reporter *lacZ* gene was only expressed in the monkey receiving the pGfa2-LacZ plasmid, whereas there is no expression of the control vector in the monkeys that received the TH vector (**Fig. 4**).



(Fig. 4) Transgenic TH and *lacZ* mRNA detection by RT-PCR. **A)** Detection of TH mRNA; 1 and 2 correspond to monkeys receiving the pGfa2-TH transgene, and 3 to the monkey receiving pGfa2-LacZ; LH and RH indicate samples obtained from the left and right putamen, respectively, from each subject, C⁺ is the PCR product from the plasmid, and C⁻ is a control reaction without cDNA; lower panel shows the detection of β-actin mRNA as a positive control. **B)** Detection of *lacZ* mRNA; 1 and 2 correspond to monkeys receiving the pGfa2-TH transgene, and 3 to the monkey receiving pGfa2-LacZ; LH and RH indicate samples obtained from the left and right putamen, respectively, from each subject, C⁺ is the PCR product from the plasmid, and C⁻ is a control reaction without cDNA; lower panel shows the detection of β-actin mRNA as a positive control.

To ensure correct expression of the transgenic proteins, western blot analyses were performed. **Fig. 5** shows a strong expression of TH in the MPTP animals that received the intracerebral gene transfer of the TH cDNA, as well as a faint TH immunoreactivity signal in the monkey treated with the control *gfa2-lacZ* vector. **Fig. 5** also shows the expression of β-galactosidase, which was only detected in the monkey that received the *gfa2-lacZ* vector.

The pattern of expression of both vectors across the three monkeys indicates suggests that the behavioral recovery observed after the *gfa2-TH* transfection is associated with the expression of TH in the lesioned striatum, since the transfer of a control transgene *gfa2-LacZ*, and the surgical procedure did not induce behavioral recovery.



(Fig.5) Expression of transgenic proteins determined by western blot analysis. **A)** Detection of TH protein; 1 and 2 correspond to monkeys receiving the pGfa2-TH transgene, and 3 to the monkey receiving pGfa2-LacZ; LH and RH indicate samples obtained from the left and right putamen, respectively, from each subject; lower panel shows the detection of β -actin as a positive control. **B)** Detection of β -galactosidase; 1 and 2 correspond to monkeys receiving the pGfa2-TH transgene, and 3 to the monkey receiving pGfa2-LacZ; LH and RH indicate samples obtained from the left and right putamen, respectively, from each subject; lower panel shows the detection of β -actin as a positive control.

3. Discussion

The present study tested if pGfa2-TH astrocytes transfection onto the putamen of MPTP treated monkeys could lead to behavioral improvement. The results show a significant behavioral improvement only in the monkeys that received the pGfa2-TH transfection, and not in a control monkey that underwent the same procedures but received a pGfa2-LacZ plasmid. These results suggest that the host astrocytes incorporated the plasmid and were able to produce enough dopamine to make significant behavioral improvements as measured in the HALLWAY task [32].

The initial behavioral analysis using the HALLWAY task showed a clear behavioral deficit after the MPTP administration. The improvement observed after L/C administration support the notion that the monkeys had a significant DA decrease produced by the MPTP neurotoxicity. The behavioral impairment followed after the L/C withdrawing not only further supports the notion of the monkeys DA impairments, but also confirms that the deficits remained present after several weeks [34].

An important issue to be addressed is the plasmid expression from the host astrocytes. Since the plasmid was injected directly into the host brain, the selection of the appropriate promoter was an important factor. Different promoters have been used depending on where the expression of the transgene is needed, for example, cytomegalovirus promoter, as well as the chicken β -actin promoter [17], has great affinity for neurons [35]. Here we used the GFAP promoter to restrict transgene expression exclusively to astrocytes [31,36]. This promoter has the advantage of being regulated, as it increases its activity in response to gliosis [37,38,39] which usually follows after any injury to the brain including PD [40,41].

The RT-PCR analysis revealed the presence of foreign mRNA into the host putaminal tissue. Both monkeys treated with pGfa2-TH showed expression of transgenic rat TH. Previous reports have shown expression of the *pGfa2-TH* transgene after intracerebral transfer in 6-OHDA-lesioned rats [30]. Since the oligonucleotides used for the assay

only recognize the rat sequence [33] we can conclude that the detected mRNA is from the injected plasmid, and not from the monkey's endogenous TH.

A second issue to be considered is the functionality of the transfected genes. Western blot analyses showed high levels of TH only in those animals that received the pGfa2-TH transgene; these were also the same animals that showed behavioral improvement. The monkey that was transfected with the pGfa2-LacZ plasmid did not show rat TH, as determined by the RT-PCR analysis. In addition, the western blot analysis showed a TH weak signal that could be residual activity from DAergic neurons spared after the MPTP administration. Elsworth et al., 2000, found that monkeys between mild and moderate parkinsonism severity, have between 10 to 65% of neurons remaining [42]. The remnant TH-positive neurons, however, were not enough to prevent behavioral impairments [42]. Also, it is clear that the surgery and the transfer of pGfa2-LacZ were not able to produce behavioral improvements [43].

These results suggest that transfection of putaminal astrocytes with gfa2-TH transgene leads to improved behavior, probably due to an increase in the release of DA in the striatum. Other approaches have produced behavioral improvements by altering the neurotransmitters and thus the electrophysiological unbalance of the dysfunctional circuits in the Basal Ganglia (BG). For example, the transfer of glutamic acid decarboxylase (GAD) into the STN of MPTP treated primates produced behavioral improvements [44]. Also, transfection of human Aromatic L-amino acid decarboxylase (hAADC) into primates previously treated with MPTP lowered l-Dopa requirements and reduced l-Dopa-induced side effects [45].

Unlike other methods, the present approach use astrocytes as the platform of choice. As previously mentioned astrocytes are capable of synthesizing DA from Levodopa, and releasing it to the culture medium [28]. Furthermore, the pGfa2-TH vector directly transferred into the striata of 6-OHDA-lesioned rats produces behavioral recovery associated with the transgene expression [30]. Also, the transcriptional control of the gfa2 promoter has been successfully shown in both C6 cells transfected with the gfa2-

TH transgene and in primary astrocytes transduced with a retroviral vector expressing TH [31]. Another important characteristic shown by genetically modified glial cells, apart from their ability to produce and release DA, is that it has been shown that they can respond to physiological stimuli. For example, they can increase the amount of DA released when depolarized with KCl or even when they are stimulated with glutamic acid [46].

The present results, together with previous reports [30,36] show that the expression of TH under the transcriptional control of the *gfa2* promoter in cells of glial origin is capable of inducing behavioral recovery in both, murine and primate experimental models of Parkinson's disease. Although these results are promising, long term studies would be needed before examining the possibility to test its capacity as a potential therapy or adjuvant to treat Parkinson's disease in humans.

In summary we report the results of genetically modifying the own host astrocytes to allow them to produce TH to synthesize and release DA into the medium. Our results show that the genetically altered system is able to synthesize enough DA in the striatum to have a significant improvement in the motor performance of primates.

4. Material and Methods

4.1 Animals

Experiments were carried out in 2 male (4.7 and 5.1kg) and one female (2.5kg) vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). Animals were kept under a controlled environment in individual cages, with light/dark cycles of 12:12 hours, temperature of $24 \pm 1^\circ \text{C}$ and $50 \pm 10\%$ relative humidity, with free access to water, fruits, vegetables and food pellets (High Protein Monkey Chow of Lab Chows, Purina®). The animals were maintained in conditions according to the Mexican official norm (NOM-062-ZOO-1999). We followed the engineering specifications for the well-taken care of production and use of the laboratory animals as well as the regulations for animal care as prescribed in the Veterinary Medicine Faculty, National University of Mexico.

4.2 MPTP Treatment

A room with all the necessary security and safety measures for the animals and the researchers was prepared and secured. All the personnel security protocols were followed [47]. Parkinsonism was produced following standard treatment [34] with MPTP hydrochloride (Sigma, St Louis, USA) dissolved in saline solution. The monkeys were administered an accumulated dose from 2.0 to 2.5 mg/Kg divided into 4 to 5 intramuscular doses of 0.5 mg/Kg in a period of 4 to 5 days until they presented a stable extra-pyramidal syndrome [34]. After MPTP treatment, monkeys were closely monitored; they were provided with sufficient water and food to maintain their corporal weight and general well being.

4.3 Levodopa Treatment

Once the behavioral evaluation period after MPTP intoxication was finished, Levodopa/Carbidopa (L/C) (Sinemet® Merck Sharp & Dohme de México S.A de C.V.) (15mg/kg) was given orally daily. After one week of LC treatment, we began with behavioral evaluations 30 minutes after the LC administration during 10 days.

4.4 Magnetic Resonance

T1 and T2 magnetic resonances images (MRI) sequences were taken from each monkey. These studies were done while monkeys had their head held in a MRI compatible stereotactic frame that was used during both the MRI imaging and the surgery. Using each monkey's MRI we localized the individual coordinates (antero-posterior, dorso-ventral and mediolateral) for the multiple targets within the putamen. Three sets of coordinates were obtained for each putamen, so a total of 9 injections were performed in each monkey.

4.5 Gene Transfer Procedure

Gene transfer was accomplished by intracerebrally transferring TH full-length cDNA, using liposomes as a delivery system. We used a rat TH cDNA driven by a human glial-specific promoter (*gfa2*) [33]. As a control, we transferred the pGfa2-LacZ plasmid, in which the expression of the *lac-Z* reporter gene is also under the transcriptional control of the *gfa2* promoter [33]. After each monkey was anaesthetized via an intramuscular (IM) injection of Zoletil 50® (Tiletamine/Zolazepam) (Laboratorios Virbac S.A.) 4mg/Kg, they were intubated in order to maintain anesthesia with inhaled Dorin® (isoflurane) (Halocarbon Laboratories). Then, standard stereotactic procedures were followed to make the cranial perforations for the injections.

Liposomes for intracerebral injections were formed following the manufacturer's instructions (Invitrogen), and as previously described [30] by mixing 6 µg of the plasmid (pGfa2-TH or pGfa2-LacZ) with 15 µl of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) followed by an incubation of 10-15 min at room temperature before injecting them into the putamen. Each subject had 9 doses per hemisphere (3 tracts with 3 different depths each), for a total of 54 µg per hemisphere of plasmid.

Monkey 1 received pGfa2-TH injections in each hemisphere in the following coordinates, 10mm lateral from the medial line, 2, 5 and 8mm superior from the external ear conducts and 24, 26 and 28mm anterior from the external ear conducts.

Monkey 2 received pGfa2-TH injections in each hemisphere in the following coordinates, 13mm lateral from the medial line, 7, 9 and 11mm superior from the external ear conducts and 10, 12 and 14mm anterior from the external ear conducts.

Monkey 3 received pGfa2-cLac injections in each hemisphere in the following coordinates, 11mm lateral from the medial line, 10, 13 and 16mm superior from the external ear conducts and 19, 20 and 21mm anterior from the external ear conducts.

Each DNA-liposome complex dose was injected through a Hamilton microsyringe at a 3 μ l per min rate. The needle was left in each place during 5 min after finishing each injection.

4.6 Behavioral task

Monkeys performance in the HALLWAY behavioral task was videotaped with 4 cameras positioned at different angles [32]. In this task the primates walk through a hallway made with a steel frame and transparent acrylic walls, whose dimensions were: 230cm length, 100cm high and 100cm wide. At the end of the hallway there were 8 holes placed at 4 shelves, with one hole to the right and one to the left on each shelf. Each monkey was required to reach to two rewards that were initially placed on the first shelf, one on each side. Once the monkey had taken them, it was to return to the beginning of the hallway. When that happened, more rewards were placed on the second shelf; this process was repeated for the third and fourth shelves; the whole process was repeated twice. The evaluation was done before and after MPTP treatment, during the acute administration of L/C, during the 10 days that followed the 15 days after withdrawing the

L/C, and finally one month after the gene therapy procedure. Using Adobe Premiere 6.0 ® software, the four different angle takes were synchronized, and then placed together in a composition fitting the screen using After Effects 5.5 ® software. The final projects were saved in Quick Time ® format. The analysis of the videos consisted in frame by frame quantifications of displacement time across the hallway, reaching time towards the rewards, and ingestion time.

4.7 Brain tissue analysis

After the evaluations were done, each monkey received a pentobarbital overdose. The brains were extracted and cut; the slices of interest were separated in two groups of samples. The samples were frozen in dry ice to perform RT-PCR assays using oligonucleotides that exclusively recognize either a rat TH sequence, [33], and *lacZ* [37,48] or β -actin [49]. The frozen samples were also used for western blot analysis. Briefly, the expression of TH protein was determined as previously described [33], using a polyclonal antibody (Cell Signaling, 1:1000), and β -galactosidase determined using a monoclonal antibody (Promega, 1:100), blots were incubated overnight at 4°C, washed and then incubated with goat antirabbit (Jackson ImmunoResearch, 1:5000) or goat antimouse (Zymed, 1:2000) peroxidase-coupled secondary antibodies, followed by enhanced chemiluminescence to reveal the proteins (Perkin Elmer). As a positive control, blots were stripped and re-probed with an anti- β -actin antibody [50]. Images from films were digitally acquired with a BioDoc-It Imaging System (UVP).

4.8 Statistical analysis

Intra-individual comparisons of the behavioral results were made using a two-way ANOVA for repeated measures (RM-ANOVA) followed by *post-hoc* Bonferroni test for multiple comparisons ($p < 0.05$).

Greenhouse-Geisser corrections to adjust degrees of freedom were performed in instances where the null hypotheses of sphericity test were rejected. Analyses were

made for each subject set of data. Data analysis included those obtained prospectively from the baseline condition, acquired after the MPTP administration, during treatment with L/C, and without any treatment and after the gene therapy transfection.

Acknowledgements

We thank, Enrique Campos for his technical assistance with the artwork. This work was supported by CONACYT 186041, CONACYT 41617- M, DGEP and UNAM-PAPIIT-IN214607.

References

1. Fuente-Fernandez R and Calne DB. (2002). Evidence for environmental causation of Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord*; **8**: 235-241.
2. Le W, Appel SH. (2004). Mutant genes responsible for Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol*; **4**: 79– 84.
3. Burns RS, LeWitt PA, Ebert MH, Pakkenberg H, and Kopin IJ. (1985). The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency: parkinsonism by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med*; **312**: 1418-1421.
4. Langston JW, Ballard PA, Tetrud JW and Irwin I. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*; **219**: 979-980.
5. Fernández-Ruiz J, Doudet DJ and Aigner TG. (1995). Long term cognitive impairment in MPTP treated rhesus monkeys. *Neuroreport*; **7**: 102-104.
6. Langston JW, Forno LS, Robert CS and Irwin I. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res*; **292**: 390-394.
7. Burns RS, Kelly E, Reavill C, Jenner P, and Marsden CD. (1984). Repeated administration of n-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurons. *Biochem Pharmacol*; **33**: 1747-1752.
8. Di Paolo T, Bedard P, Daigle M and Boucher R. (1986). Long-term effects of MPTP on central and peripheal catecholamine and indoleamine concentrations in monkeys. *Brain Res*; **379**: 286-293.
9. Elsworth JD, Deutch AY, Redmond Jr DE, Taylor JR, Sladek JR and Roth RH. (1989). Symptomatic and asymptomatic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated primates: biochemical changes in striatal regions. *Neuroscience*; **33**: 323-31.
10. Jenner P, Rupniak NMJ, Rose J, Kelly E, Kilpatrick G, Lees A et al. (1984). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci Lett*; **50**: 85-90.
11. Fernández-Ruiz J, Doudet D, Aigner TG. (1999). Spatial memory improvement by levodopa in parkinsonian MPTP-treated monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*; **147**(1): 104-7.
12. Elsworth JD, Brittan MS, Taylor JR, Sladek JR Jr, Redmond DE Jr, Innis RB, et al. (1998). Upregulation of striatal D2 receptors in the MPTP-treated vervet monkey is reversed by grafts of fetal ventral mesencephalon: an autoradiographic study. *Brain Res*; **795**: 55–62.
13. Luquin MR, Montoro RJ, Guillén J, Saldise L, Insausti R, Del Río J, et al. (1999). Recovery of Chronic Parkinsonian Monkeys by Autotransplants of Carotid Body Cell Aggregates into Putamen. *Neuron*; **22**: 743–750.
14. Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, et al. (2002). Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple

- transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther*; **13**(3): 345-54.
15. Hadj Tahar A, Grégoire L, Darré A, Bélanger N, Meltzer L, and Bédard PJ. (2004). Effect of a selective glutamate antagonist on L-dopa-induced dyskinesias in drug-naive parkinsonian monkeys. *Neurobiol Dis*; **15**: 171–176.
 16. Calon F, Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet PJ, Bédard PJ, et al. (1999). Chronic D1 and D2 dopaminomimetic treatment of MPTP-denervated monkeys: effects on basal ganglia GABA_A/ benzodiazepine receptor complex and GABA content. *Neurochem Int*; **35**: 81-91.
 17. Eslamboli A, Georgievska B, Ridley RM, Baker HF, Muzyczka N, Burger C, et al. (2005). Continuous Low-Level Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Delivery Using Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors Provides Neuroprotection and Induces Behavioral Recovery in a Primate Model of Parkinson's Disease. *J Neurosci*; **25**(4): 769 –777.
 18. Ahlskog JE, Muenter MD. (2001). Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord*; **16**: 448-58.
 19. Van Gerpen JA, Kumar N, Bower JH, Weigand S, Ahlskog JE. (2006). Levodopa-associated dyskinesia risk among Parkinson disease patients in Olmstead county, Minnesota, 1976-1990. *Arch Neurol*; **63**: 205-9.
 20. Schrag A, Ben Shlomo Y, Brown R, Marsden CD, Quinn N. (1998). Young-onset Parkinson's disease revisited-clinical features, natural history, and mortality. *Mov Disord*; **13**: 885-94.
 21. Golbe LI. (1991). Young-onset Parkinson's disease: a clinical review. *Neurology*; **41**: 168-73.
 22. Obeso JA, Grandas F, Vaamonde J, Luquin MR, Artieda J, Lera G, et al. (1989). Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology*; **39** (Suppl 2): 11-9.
 23. Freed CR, Greene PE, Brezze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, et al. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's Disease. *N Engl J Med*; **344**(10): 710-719.
 24. Bankiewicz KS, Eberling JL, Kohutnicka M, Jagust W, Pivrotto P, Bringas J, et al. (2000). Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys: in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol*; **164**: 2-14.
 25. During MJ, Naegele JR, O'Malley KL. (1994). Long-term behavioral recovery in parkinsonian rats by an HSV vector expressing tyrosine hydroxylase. *Science*; **266**: 1399-403.
 26. Leone P, McPhee WJ, Janson CG, Davidson BL, Freese A, During MJ. (2000). Multi-site partitioned delivery of human tyrosine hydroxylase gene with phenotypic recovery in Parkinsonian rats. *Neuroreport*; **11**: 1145-51.

27. Shen Y, Muramatsu SI, Ikeguchi K, Fujimoto KI, Fan DS, Ogawa M, et al. (2000). Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther*; **11**: 1509-19.
28. Juorio AV, Li X-M, Walz W, Paterson IA. (1993). Decarboxylation of L-dopa by cultured mouse astrocytes. *Brain Res*; **626**: 306-09
29. Tsai MJ., Lee EHY. (1996). Characterization of L-dopa transport in cultures rat and mouse astrocytes. *J Neurosci Res*; **43**: 490-95
30. Segovia J, Vergara P, Brenner M. (1998b). Astrocyte-specific expression of tyrosine hydroxylase after intracerebral gene transfer induces behavioral recovery in experimental parkinsonism. *Gene Ther*; **5**: 1650-5.
31. Trejo F, Vergara P, Brenner M, Segovia J. (1999a). Gene therapy in a rodent model of Parkinson's disease using differentiated C6 cells expressing a GFAP-tyrosine hydroxylase transgene. *Life Sci*; **65**(5): 483-91.
32. Campos-Romo A, Ojeda-Flores R, Moreno-Briseño P, Fernández-Ruiz J. (2009). Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian primates in the HALLWAY task. *J Neurosci Meth*; **177**: 361-68
33. Segovia J, Vergara P, and Brenner M. (1998a). Differentiation-dependent expression of transgenes in engineered astrocyte cell lines. *Neurosci Lett*: **242**: 172-176.
34. Taylor JR, Elsworth JD, Roth RH, Sladek JR Jr and Redmond DE Jr. (1997). Severe long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops sabaues*). *Neuroscience*; **81**: 745–755.
35. Eberling JL, Kells AP, Pivrotto P, Beyer J, Bringas J, Federoff HJ, et al. (2009). Functional Effects of AAV2-GDNF on the Dopaminergic Nigrostriatal Pathway in Parkinsonian Rhesus Monkeys. *Hum Gene Ther*. **20**(5): 511-8.
36. Trejo F, Vergara P, Brenner M, and Segovia J. (1999b). Biosynthetic capacity of C6 cells engineered with a glial fibrillary acidic protein-tyrosine hydroxylase transgene. *Med Sci Res*; **27**: 423-425.
37. Brenner M, Kisseberth WC, Su Y, Besnard F, Mesing A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci*; **14**: 1030-37.
38. Galou M, Pournin S, Ensergueix D, Ridet JL, Tchélingérain JL, Lossouarn L, et al. (1994). Normal and pathological expression of GFAP promoter elements in transgenic mice. *Glia*; **12**: 281-93.
39. Johnson WB, Rupe MD, Rockenstein EM, Price J, Sarty VP, Verderber LC, et al. (1995). Indicator expression directed by regulatory sequences of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene: in vivo comparison of distinct GFAP-LacZ transgenes. *Glia*; **13**: 174-84.

40. Forno LS, Delanney LE, Irwin I, Di Monte D and Langston JW. (1992). Astrocytes and Parkinson disease. *Prog Brain Res*; **94**: 429-36.
41. De la Monte SM, Wells SE, Hedley-Whyte T, and Growdon JH. (1989). Neuropathological distinction between Parkinson's dementia and Parkinson's plus Alzheimer's disease. *Ann Neurol*; **26**: 309-20.
42. Elsworth JD, Taylor JR, Sladek JR Jr, Collier TJ, Redmond DE JR and Roth RH. (2000). Striatal dopaminergic correlates of stable parkinsonism and degree of recovery in old- world primates one year after MPTP treatment. *Neuroscience*; **95**: 399-408.
43. Taylor JR, Elsworth JD, Sladek JR Jr, Collier TJ, Roth RH, Redmond DE Jr. (1995). Sham surgery does not ameliorate MPTP-induced behavioral deficits in monkeys. *Cell transplant*; **4**: 13-26.
44. Emborg ME, Carbon M, Holden JE, During MJ, Ma Y, Tang C, et al. (2007). Subthalamic glutamic acid decarboxylase gene therapy: changes in motor function and cortical metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*; **27**(3): 501-9.
45. Bankiewicz KS, Forsayeth J, Eberling JL, Sanchez-Pernaute R, Pivrotto P, Bringas J, et al. (2006). Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC. *Mol Ther*; **14** (4): 564-70
46. Guerrero-Cázares H, Alatorre-Carranza MP, Delgado-Rizo V, Duenas-Jiménez JM, Mendoza-Magana ML, Morales-Villagran A, et al. (2007). Dopamine release modifies intracellular calcium in tyrosine hydroxylase-transfected C6 cells. *Brain Res Bull.* **74**,113-118.
47. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, et al. (2001). The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem*; **76**: 1265-1274.
48. Domínguez-Monzón G, Benítez JA, Vergara P, Lorenzana R, and Segovia J. (2009). Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *Int. J Develop Neurosci*; **27**: 305-313.
49. Benítez, JA, Arregui, L, Vergara P, and Segovia J. (2007). Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas. *Cancer Gene Ther*; **14**, 836-846.
50. García-Tovar CG, Pérez A, Luna J, Mena R, Osorio B, Alemán V, et al. (2001). Biochemical and histochemical analysis of 71 kDa dystrophin isoform (Dp71f) in rat brain. *Acta Histochem*; **103**(2): 209-24.

8. DISCUSIÓN

Este trabajo se dividió en 2 partes: primero, la creación del método de evaluación y segundo la utilización de dicho método para evaluar los cambios producidos por la transfección de un transgen que codifica para la enzima TH que es la enzima necesaria para que los astrocitos sean capaces de producir DA.

Método de Evaluación

La creación de este método nuevo obedece a la necesidad de contar con un método objetivo para la evaluación del modelo de MPTP en primates no humanos, ya que en la mayoría de los estudios realizados se utilizan escalas que miden diferentes conductas y son subjetivas ya que dependen del criterio y experiencia del observador.

Los resultados obtenidos, nos permiten obtener medidas cuantitativas de comportamientos específicos en monos en libre movimiento, usando grabaciones en video y una computadora personal en la tarea del pasillo.

La tarea es sensible a cambios producidos por la administración de MPTP, así como a efectos terapéuticos producidos por la administración de Levodopa/Carbidopa y la terapia génica. Este método permite la separación y cuantificación de conductas específicas como traslación del animal, agarre con la mano, alimentación; éstas conductas son prácticamente imposibles de evaluar usando sistemas automáticos, o bien dependen totalmente del criterio subjetivo de un observador. Además, usando este sistema de video es posible cuantificar comportamientos que son similares a aquellos que afectan a humanos con EP en su vida cotidiana.

Se han utilizado otros sistemas para medir la actividad locomotriz en primates no humanos, (Barcia et al., 2004; Gerber et al., 2000; Horii et al., 2002; Robinson et al., 1993) demostrando la utilidad del sistema de telemetría para evaluar la actividad motora circadiana en condiciones fisiológicas. Experimentos previos, hechos en macacos usaron un sistema similar para medir la temperatura y la actividad motora circadiana (Aureli et al., 1999; Mehlman et al., 2000; Chassain et al., 2001). Este grupo utilizó un sistema de video el cual es capaz de calcular en tiempo real, la cantidad y calidad de los movimientos de los monos en sus jaulas. Midieron la actividad de cada animal, separándolos en tres estados: el primero corresponde a inactividad; el segundo a actividad normal; y el tercero a hiperactividad. El sistema de video que ellos probaron fue capaz de cuantificar cambios de actividad tras la administración de MPTP y del subsecuente tratamiento, especialmente durante los tiempos de hiperactividad. Del mismo modo cuantificaron varias conductas específicas de los monos, las cuales suelen ser evaluadas mediante escalas clínicas, tales como escalada, interacción social y conductas de alimentación.

En comparación con esos métodos, el desarrollado en este trabajo, cuenta con varias ventajas. En primer lugar, el montaje es simple y fácil de usar; el sistema comprende cuatro cámaras de video localizadas en diferentes ángulos del pasillo, y una computadora personal para calcular el tiempo que les tomó a los monos realizar las diferentes fases de la tarea. Segundo, los monos son evaluados realizando una tarea específica para medir el control motor, tanto fino como grueso, incluyendo la traslación de un punto a otro y no solo su actividad dentro de la jaula. Tercero, es posible evaluar la actividad motora que corresponde a algunos de los síntomas que aquejan con mayor frecuencia a los pacientes con EP, como alteraciones en la marcha, dificultad para iniciar los movimientos o realizar movimientos súbitos, así como la utilización de los miembros superiores para su alimentación, u otras tareas cotidianas.

Nuestro método permite la medición del desempeño de cada sujeto de forma independiente. Esto es importante, ya que cada mono puede realizar la tarea a su manera, es decir, algunos monos son más pasivos que otros. Aunque los análisis muestran diferencias individuales en los tiempos basales, después de la administración de MPTP todos los tiempos medidos fueron significativamente mayores, con excepción del tiempo de desplazamiento en el mono 3 el cual mostró una importante bradicinesia al inicio de las corridas, pero una vez iniciado el movimiento, el mono se movía rápidamente, probablemente por la misma inercia que lo mantenía quieto al inicio de la corrida.

Con el tratamiento farmacológico, a los animales les tomó menos tiempo cruzar el pasillo. Ésto sugiere que el método de evaluación es sensible a los cambios, mediados por el tratamiento con Levodopa/Carbidopa en la realización de la tarea. Ésto es evidente de igual manera, ya que se detectó un tiempo mayor durante la realización de la prueba al retirar el tratamiento. Para demostrar la sensibilidad del método a los cambios inducidos por tratamientos farmacológicos, a dos monos se les probó 90 minutos después de la administración de Levodopa/Carbidopa (una vida media) y los resultados mostraron que en general el desempeño continuó siendo mejor que el observado durante la condición de MPTP, pero peor que el desempeño a los 30 minutos de la administración de Levodopa/Carbidopa.

La sensibilidad del método de pasillo a diferentes concentraciones plasmáticas de la combinación de fármacos fue más evidente en el mono 3. En todos los casos, sin embargo, encontramos que cuando el tratamiento con levodopa se suspendió el desempeño fue peor, aunque no alcanzó los niveles de la condición de MPTP inicial. Una posible explicación para este efecto, es que puede haber mejoría conductual que se ha visto en monos tratados, monos con cirugía control y monos no operados (Taylor

et al., 1995), o simplemente que el mono adquirió experiencia para desempeñar la tarea, y lo hace más eficientemente.

Las correlaciones entre la escala UPDRS y los tiempos obtenidos en el pasillo, sugieren que, aunque ambas se ven afectadas por factores similares (ej. deficiencia de DA o administración de Levodopa/Carbidopa), existen diferencias en los aspectos conductuales que miden. Por ejemplo, mientras que el temblor en reposo y la marcha mostraron una correlación significativa con el tiempo de desplazamiento, de alcance y de ingesta medidos en el pasillo, estos mismos tres tiempos no tuvieron una correlación significativa con el temblor de acción de la escala UPDRS.

Terapia Génica

En éste estudio se probó si la transfección del plásmido pGfa2-TH en astrocitos de monos tratados con MPTP da lugar a una mejoría conductual. Los resultados muestran una mejoría significativa solo en los monos que recibieron el pGfa2-TH, y no en el mono control, el cual fue sometido a los mismos procedimientos, pero recibió el plásmido pGfa2-LacZ. Estos resultados sugieren que los astrocitos del huésped introducen el plásmido y fueron capaces de producir suficiente DA para producir una mejoría conductual como se muestra en la tarea del pasillo (Campos-Romo et al., 2009).

El análisis conductual inicial usando la tarea de pasillo muestra claramente una deficiencia tras la administración del MPTP. La mejoría observada tras la administración de Levodopa/Carbidopa soporta la idea de que el mono tuvo una deficiencia de DA producto de la neurotoxicidad del MPTP. La deficiencia conductual tras el lavado de la Levodopa/Carbidopa no solo soporta la idea de la deficiencia de DA, sino que también confirma que la disminución de la misma permanece presente después de varias semanas (Taylor et al., 1997).

Un punto importante que mencionar es que la expresión del plásmido se da desde los astrocitos del huésped. Ya que el plásmido fue inyectado directamente en el cerebro del huésped, y este puede ser endocitado por cualquier célula, la selección apropiada del promotor fue un factor fundamental. Diferentes promotores se han utilizado dependiendo el sitio donde se necesite la expresión del transgen, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus, así como el promotor de β -actina de pollo (Estamboli et al., 2005), tienen una gran afinidad por neuronas (Eberling et al., 2009). En este trabajo usamos el promotor de GFAP para restringir la expresión del transgen en los astrocitos (Trejo et al 1999a, Trejo et al., 1999b). Este promotor cuenta con la ventaja de ser regulado, mediante el aumento de su actividad en respuesta a gliosis (Brenner

et al., 1994, Galou et al., 1994, Johnson et al., 1995) la cual se presenta tras cualquier lesión en el cerebro incluyendo la EP (Forno et al., 1992, De la Monte et al., 1989).

El análisis con RT-PCR reveló la presencia de mRNA extraño en el tejido putaminal del huésped. Ambos monos tratados con el pGfa2-TH mostraron expresión de TH de rata.

Reportes anteriores mostraron la expresión del transgen pGfa2-TH tras la transferencia intracerebral en ratas lesionadas con 6-OHDA (Segovia et al., 1998b). Ya que los oligonucleótidos usados para el ensayo solo reconocen la secuencia de TH de rata (Segovia et al., 1998a) podemos concluir que el mRNA detectado es del plásmido inyectado y no TH endógena propia del mono.

Un segundo punto a ser considerado es la función de los genes transfectados. Los análisis de Western blot mostraron altos niveles de TH solo en los animales que recibieron el transgen pGfa2-TH; estos fueron también los mismos animales que mostraron mejoría conductual.

El mono que fue transfectado con el plásmido pGfa2-LacZ no mostró TH de rata mediante el análisis de RT-PCR. Además, el resultado del Western blot mostró una débil señal de TH la cual puede ser por actividad dopaminérgica residual de las neuronas sobrevivientes tras la administración de MPTP. Elsworth et al., 2000, encontraron que los monos con severidad del parkinsonismo entre leve y moderado conservan entre 10 y 65% de neuronas (Elsworth et al., 2000)

Sin embargo las neuronas TH-positivas restantes, no son suficientes para evitar que exista un deterioro conductual (Elsworth et al., 2000). También es claro que la cirugía y la transferencia del pGfa2-LacZ no fueron capaces de inducir mejoría conductual (Taylor et al., 1995).

Estos resultados sugieren que la transfección de astrocitos putaminales con el transgen pGfa2-TH generan una mejoría en la conducta, probablemente debido al aumento en la producción y liberación de DA en el estriado. Otras aproximaciones han probado ser efectivas para generar mejoría conductual mediante la alteración de neurotransmisores y la consecuente alteración del balance fisiológico de los circuitos de los Ganglios Basales (GB). Por ejemplo, la transferencia de la descarboxilasa de ácido glutámico (DAG) en el NST de primates tratados con MPTP, la cual produce mejoría conductual (Emborg et al., 2007). Del mismo modo la transfección de la descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (DAA) en primates previamente tratados con MPTP, consiguió bajar los requerimientos de levodopa así como disminuir los efectos secundarios inducidos por este fármaco (Bankiewicz et al., 2006).

A diferencia de otros métodos, el que presentamos tiene como objetivo usar los astrocitos como plataforma. Como se mencionó anteriormente los astrocitos son

capaces de sintetizar DA desde levodopa y liberarla al medio (Juorio et al., 1993). Además el vector de pGfa2-TH transfectado directamente en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA produce recuperación conductual asociada con la expresión del transgen (Segovia et al., 1998b). También el control transcripcional del promotor gfa2 ha demostrado ser exitoso tanto en células C6 transfectadas con el transgen pGfa2-TH como en astrocitos primarios transfectados con un vector retroviral para expresar TH (Trejo et al., 1999a). Otra característica importante mostrada mediante la modificación genética de células gliales, además de su habilidad para sintetizar y liberar DA, es que pueden responder a estímulos fisiológicos. Por ejemplo pueden aumentar la cantidad de DA liberada cuando se despolariza con KCl o incluso cuando son estimulados con ácido glutámico (Guerrero-Cázares et al., 2007).

Estos resultados junto con reportes previos (Segovia et al., 1998b, Trejo et al., 1999b) muestran que la expresión de TH bajo el control transcripcional del promotor gfa2 en células gliales, es capaz de inducir una mejoría conductual tanto en modelos de EP de murinos como de primates no humanos.

Aunque estos resultados son prometedores, es necesario realizar estudios a largo plazo antes de examinar la posibilidad de probar su capacidad como una potencial terapia para el manejo de la EP en humanos.

En resumen, los resultados de la modificación genética de los astrocitos del huésped les permiten producir TH con la finalidad de sintetizar y liberar DA al medio. Nuestros resultados sugieren que la modificación genética de los astrocitos de la región putaminal puede permitir la síntesis de suficiente DA en el estriado como para producir una mejoría significativa en el desempeño motor de los primates.

9. CONCLUSIONES

El método de evaluación en el pasillo conductual es una forma sensible y objetiva, así como reproducible para evaluar el comportamiento motor de primates no-humanos con parkinsonismo, con o sin manejo terapéutico.

A diferencia de la mayoría de los estudios realizados en modelos de primates con MPTP, a los cuales se les realiza terapia génica, nosotros usamos astrocitos como blanco ya que de esta manera se busca tener un tipo celular con mayor resistencia al microambiente que existe en los enfermos con EP, el cual a la larga puede terminar con la vasta mayoría de las neuronas dopaminérgicas del área.

Los resultados obtenidos tras la transfección del trasgen gfa2-TH en ambos monos, nos permite decir que los astrocitos son una buena plataforma para la expresión de TH, y probablemente para la síntesis de DA, además de que dicha expresión es suficiente para generar mejoría conductual en el modelo de MPTP en primates no-humanos.

III. REFERENCIAS

- Alegre M, Labarga A, Gurtubay IG, et al. (2003) Movement-related changes in cortical oscillatory activity in ballistic, sustained and negative movements. *Exp Brain Res*; **148**:17–25.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*; **9**:357-381.
- Allen GS, Burns RS, Tulipan NB, Parker RA. (1989) Adrenal medullary transplantation to the caudate nucleus in Parkinson's disease: initial clinical results in 18 patients. *Arch Neurol*; **46**: 487-91.
- Alonso-Frech F, Zamarbide I, Alegre M, et al. (2006) Slow oscillatory activity and levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Brain*; **129**:1748 –1757.
- Álvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*; **22**: 629-34.
- Andrews CJ, Burke JD, Lance JW. (1972) The response to muscle stretch and shortening in parkinsonian rigidity. *Brain*; **95**:795– 812.
- Apuzzo ML, Neal JH, Waters CH, Appley AJ, Boyd SD, Couldwell WT, et al. (1990) Utilization of unilateral and bilateral stereotactically placed adrenomedullary-striatal autografts in parkinsonian humans: rationale, techniques, and observations. *Neurosurgery*; **26**: 746-57.
- Araque A., Martin E.D., Perea G., Arellano J.I. and Buño W. (2002) Synaptically-released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *Journal of Neuroscience* **22**, 2443–2450.
- Araque A. (2008) Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biology* **4**(1), 3-10
- Arenas E. (2002) Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*; **57**: 795-808.
- Arjona V, Mínguez-Castellanos A, Montoro RJ, Ortega A, Escamilla F, Toledo-Aral JJ, et al. (2003) Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery*; **53**: 321-30.
- Assal F, Spahr L, Hadengue A, Rubbia-Brandt L, Burkhard PR, Rubbici-Brandt L. (1998) Tolcapone and fulminant hepatitis. *Lancet*; **352**: 958.
- Aureli F, Preston SD, de Waal FB. (1999) Heart rate responses to social interactions in free-moving rhesus macaques (*Macaca mulatta*): a pilot study. *J Comp Psychol*; **113**:59–65.

- Backlund EO, Grandberg PO, Hamberger B, Kuntsson E, Martensson A, Goran S, et al. (1985) Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in Parkinsonism: first clinical trials. *J Neurosurg*; **62**: 169-73.
- Bakay RAE, Barrow DL, Fiandaca MS, Iuvone PM, Schiff A, Collins DC. (1987) Biochemical and behavioural correction of MPTP-like syndrome by fetal cell transplantation. *Ann NY Acad Sci*; **495**: 623-38.
- Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, et al. (2000) Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. *Neurology*; **55**: 1358-63.
- Ballard, P.A., Tetrad, J.W., Langston, J.W., (1985) Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* **35**, 949-956.
- Bankiewicz, K.S., Oldfield, E.H., Chiueh, C.C., Doppman, J.L., Jacobowitz, D.M., Kopin, I.J. (1986) Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Science* **39**, 7-16.
- Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Kopin IJ, Jacobowitz DM, London WT, Olfeld E. (1988) Transient behavioural recovery in hemiparkinsonian primates after adrenal medullary allografts. *Prog Brain Res*, **78**: 543-50.
- Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Jacobowitz DM, Porrino L, Di Porzio U, London WT, et al. (1990) The effect of fetal mesencephalon implants on primate MPTP-induced parkinsonism: histochemical and behavioral studies. *J Neurosurg*; **72**: 231-44.
- Bankiewicz KS, Eberling JL, Kohutnicka M, Jagust W, Pivrotto P, Bringas J, et al. (2000) Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys: in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol*; **164**: 2-14.
- Bankiewicz KS, Forsayeth J, Eberling JL, Sanchez-Pernaute R, Pivrotto P, Bringas J, Herscovitch P, Carson RE, Eckelman W, Reutter B, Cunningham J. (2006) Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC. *Mol Ther. Oct*; **14**(4):564-70
- Barcia C, De Pablos V, Bautista-Hernández V, Sanchez-Bahillo A, Fernández-Barreiro A, Poza M, et al. (2004) Measurement of motor disability in MPTP-treated macaques using a telemetry system for estimating circadian motor activity. *J Neurosci Methods Mar* **15**;134(1):59-64.
- Barnham KJ, Bush AI. (2008) Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Opin Chem Biol. Apr*; **12** (2): 222-8.
- Basso MA, Powers AS, Evinger C. (1996) An explanation for reflex blink hyperexcitability in Parkinson's disease. *J Neurosci*; **16**:7308 -7317.

- Beal MF. (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*; **2**: 325-32.
- Benazzouz, A., Gross, C., Dupont, J., Bioulac, B., (1992) MPTP induced hemiparkinsonism in monkeys: behavioral, mechanographic, electromyographic and immunohistochemical studies. *Experimental Brain Research* **90**, 116–120.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR. (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol*; **72**:507–520.
- Beric A, Kelly PJ, Rezai A, Sterio D, Mogilner A, Zonenshayn M, Kopell B.(2001) Complications of deep brain stimulation surgery. *Stereotact Funct Neurosurg*; **77** (1-4):73-8.
- Bevan MD, Magill PJ, Terman D, et al. (2002) Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci*; **25**:525-531.
- Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., Crossman, A.R., Bioulac, B., Brotchie, J.M., Gross, C.E. (2001) Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience* **21**, 6853–6861.
- Bezard E, Gross MC, Brotchie JM. (2003) Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci*; **26**:215–221.
- Bing GY, Notter MF, Hansen JT, Gash DM. (1988) Comparison of adrenal medullary, carotid body and PC12 cell grafts in 6-OHDA lesioned rats. *Brain Res Bull*; **20**: 399-406.
- Bing GY, Notter MF, Hansen JT, Kellogg C, Kordower JH, Gash DM. (1990) Cografts of adrenal medulla with C6 glioma cells in rat with 6-hydroxydopamine- induced lesions. *Neuroscience*; **34**: 687-97.
- Björklund A, Stenevi U. (1979) Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res*; **177**: 555-60.
- Björklund A, Dunnett SB, Stenevi U, Lewis ME, Iversen SD. (1980) Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res*; **199**: 307-33.
- Björklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Iversen SD. (1981) Functional reactivation of the deafferented neostriatum by nigral transplants. *Nature*; **289**: 497-9.
- Björklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KSP, et al. (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA*; **99**: 2344-9.

- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*; **24**: 197–211.
- Brenner M., Kisseberth WC., Su Y., Besnard F., Mesing A. (1994) GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice, *J Neurosci*; **14**: 1030– 37.
- Brown, R.G., Marsden, C.D. (1990) Cognitive function in Parkinson's disease: from description to theory. *Trends in Neurosciences* **13**, 21–29.
- Brown P. (2003) Oscillatory nature of human basal ganglia activity: relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov Disord*; **18**:357–363.
- Brundin P, Widner H, Nilsson OG, Strecker RE, Bjorklund A. (1989) Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res*; **75**: 195-207.
- Burchiel KJ. (1995) Thalamotomy for movement disorders. *Neurosurg Clin N Am. Jan*; **6**(1): 55-71.
- Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobowitz, D.M., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 4546–4550.
- Cahill DW, Olanow CW. (1990) Autologous adrenal medulla to caudate nucleus transplantation in advanced Parkinson's disease: 18 months results. *Prog Brain Res*; **82**: 637-42.
- Calne S, Schoenberg B, Martin W, Uitti RJ, Spencer P, Calne DB. (1987) Familial Parkinson's disease: possible role of environmental factors. *Can J Neurol Sci*; **14**: 303–05.
- Campos-Romo A, Ojeda-Flores R, Moreno-Briseño P, Fernandez-Ruiz J. (2009) Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian primates in the HALLWAY task. *J Neurosci Methods. Mar* **15**;177(2):361-8.
- Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A, et al. (2001) A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol*; **171**: 98-108.
- Casals J, Elizan TS, Yahr MD. (1998) Postencephalitic parkinsonism: a review. *J Neural Transm*; **105**: 645–76.
- Chassain C, Eschalier A, Durif F.(2001) Assessment of motor behavior using a video system and clinical rating scale in parkinsonian monkeys lesioned by MPTP. *J Neurosci Methods*; **111**:9–16.

- Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM. (2001) Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat*; **21**: 277-88.
- Chiueh, C.C., Burns, R.S., Markey, S.P., Jacobowitz, D.M., Kopin, I.J. (1985) Primate model of parkinsonism: selective lesion of nigrostriatal neurons by 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine produces an extrapyramidal syndrome in rhesus monkeys. *Life Science* **36**, 213–218.
- Cordes M, Snow BJ, Cooper S, et al. (1994) Age-dependent decline of nigrostriatal dopaminergic function: a positron emission tomographic study of grandparents and their grandchildren. *Ann Neurol*; **36**: 667–70.
- Czyzyk-Krzeska MF, Bayliss DA, Lawson EE, Millhorn DE. (1992) Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J Neurochem*; **58**: 1538-56.
- Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S, et al. (1997) Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med*; **3**: 350-3.
- Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, Ratliff J, Isacson O. (1998) Blastula-derived stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol*; **149**: 28-41.
- Dejean C, Gross CE, Bioulac B, Boraud T. (2008) Dynamic changes in the cortex-basal ganglia network after dopamine depletion. *J Neurophysiol*; **100**:385–396.
- Defer GL, Geny C, Ricolfi F, Fenelon G, Monfort JC, Remy P, et al. (1996) Long-term outcome of unilaterally transplanted parkinsonian patients: I: clinical approach. *Brain*; **119**: 41-50.
- De la Monte SM., Wells SE., Hedley-Whyte T, and Growdon JH. (1989) Neuropathological distinction between Parkinson's dementia and Parkinson's plus Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*; **26**: 309-20.
- DeLong MR, Georgopoulos AP. (1981) Motor functions of the basal ganglia. In: Brookhart JM, Mountcastle VB, Brooks VB, Geiger SR, eds. *Handbook of Physiology: The Nervous System: Motor Control*. Vol II. Bethesda, Md: American Physiological Society:1017-1061.
- DeLong MR, Wichmann T. (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol*; **64**: 20-24.
- De Rijk MC, Launer LJ, Berger K, et al. (2000) Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. *Neurology*, **54** (11 suppl 5): S21–23.
- Dunnett SB, Björklund A, Stenevi U, Iversen SD. (1981) Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res*; **215**: 147-61.

- Doudet, D., Gross, C., Lebrun Grandie, P., Bioulac, B., (1985) MPTP primate model of Parkinson's disease: a mechanographic and electromyographic study. *Brain Research* **335**, 194–199.
- Dunnett SB, Hernández TD, Summerfield A, Jones GH, Arbuthnott G. (1988) Graft-derived recovery from 6-OHDA lesions: specificity of ventral mesencephalic graft tissues. *Exp Brain Res*; **71**: 411-24.
- Dunnett SB, Björklund A, Lindvall O. (2001) Cell therapy in Parkinson's disease: stop or go? *Nature Rev Neurosci*; **2**: 365-9.
- During MJ, Naegel JR, O'Malley KL. (1994) Long-term behavioral recovery in parkinsonian rats by an HSV vector expressing tyrosine hydroxylase. *Science*; **266**: 1399-403.
- Eberling, J.L., Jagust, W.J., Taylor, S., Bringas, J., Pivrotto, P., VanBrocklin, H.F., Bankiewicz, K.S. (1998) A novel MPTP primate model of Parkinson's disease: neurochemical and clinical changes. *Brain Research* **805**, 259–262.
- Eberling JL, Kells AP, Pivrotto P, Beyer J, Bringas J, Federoff HJ, Forsayeth J, Bankiewicz KS. (2009) Functional Effects of AAV2-GDNF on the Dopaminergic Nigrostriatal Pathway in Parkinsonian Rhesus Monkeys. *Hum Gene Ther. May*; **20**(5):511-8.
- Elsworth, J.D., Taylor, J.R., Sladek Jr., J., Collier, T.J., Redmond, D.E.J., Roth, R.H., (2000) Striatal dopaminergic correlates of stable parkinsonism and degree of recovery in old-world primates one year after MPTP treatment. *Neuroscience* **95**, 399–408.
- Emborg ME, Carbon M, Holden JE, During MJ, Ma Y, Tang C, Moirano J, Fitzsimons H, Roitberg BZ, Tuccar E, Roberts A, Kaplitt MG, Eidelberg D. (2007) Subthalamic glutamic acid decarboxylase gene therapy: changes in motor function and cortical metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab. Mar*; **27**(3):501-9
- Espejo E, Montoro RJ, Armengol JA, López-Barneo J. (1998) Cellular and functional recovery of parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron*; **20**: 197-206.
- Eslamboli A, Georgievska B, Ridley RM, Baker HF, Muzyczka N, Burger C, Mandel RJ, Annett L, Kirik D. (2005) Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurosci. Jan 26*; **25**(4):769-77.
- Etminan M, Samii A, Takkouche B, Rochon PA. (2001) Increased risk of somnolence with the new dopamine agonists in patients with Parkinson's disease: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Drug Saf*, **24**: 863–8.
- Etminan M, Gill S, Samii A. (2003) Comparison of the risk of adverse events with pramipexole and ropinirole in patients with Parkinson's disease: a meta-analysis. *Drug Saf*, **26**: 439–44.

- Fearnley JM, Lees AJ. (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*; **114**: 2283–301.
- Fernández-Ruiz J, Doudet D, Aigner TG. (1999) Spatial memory improvement by levodopa in parkinsonian MPTP-treated monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*; **147**(1): 104-7.
- Folkerth RD, Durso R. (1996) Survival and proliferation of nonneural tissues, with obstruction of cerebral ventricles, in a parkinsonian patient treated with fetal allografts. *Neurology*; **46**: 1219-25.
- Forno LS, Langston JW. (1991) Unfavourable outcome of adrenal medullary transplant for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*; **81**: 691-4.
- Forno LS., Delanney LE., Irwin I., Di Monte D and Langston JW. (1992) Astrocytes and Parkinson disease. *Prog Brain Res*; **94**: 429-36.
- Freed WJ, Morihisa J, Spoor E, Hoffer B, Olson L, Seiger Å. (1981) Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature*; **292**: 351-2.
- Freed WJ, Cannon-Spoor HE, Krauthamer E. (1986) Intrastratial adrenal medulla grafts in rats: long-term survival and behavioral effects. *J Neurosurg*; **65**: 664-70.
- Freed CR, Breeze RE, Rosenberg NL, Schneck SA, Wells TH, Barrett JN, et al. (1990) Transplantation of human fetal dopamine cells for Parkinson's disease: results at 1 year. *Arch Neurol*; **47**: 505-12.
- Freed CR, Breeze RE, Rosemberg NL, Schneck SA, Kriek E, Qi JX, et al. (1992) Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*; **327**: 1549 55.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, et al. (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*; **344**: 710-9.
- Freeman TB, Wojak J, Brandeis L, Michel J, Pearson J, Flamm E. (1988) Cross-species intracerebral grafting of embryonic swine dopaminergic neurons. *Prog Brain*; **78**: 473-7.
- Freeman TB, Olanow CW, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, et al. (1995) Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol*; **38**: 379-88.
- Freund TF, Bolam JP, Björklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Powell JF, et al. (1985) Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunochemical study. *J Neurosci*; **5**: 603-16.

- Galou M., Pournin S., Ensergueix D., Ridet JL., Tchéliingérain JL., Lossouarn L., Privat A., Rabinet C., Dupouey P. (1994) Normal and pathological expression of GFAP promoter elements in transgenic mice. *Glia*; **12**: 281-93.
- Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, Dinsmore J, Isacson O. (1996) Xenotransplantation of porcine embryonic ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. *Exp Neurol*; **140**: 1-13.
- Gamboa ET, Wolf A, Yahr MD, et al. (1974) Influenza virus antigen in postencephalitic parkinsonism brain: detection by immunofluorescence. *Arch Neurol*; **31**: 228–32.
- García-Minié R, Alberti-Amador E, Castellano-Ortega MR. (2003) Terapia génica en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol*; **36**: 1073-7.
- Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, et al. (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*; **380**: 252-5.
- Gasser T. (2001) Genetics of Parkinson's disease. *J Neurol*; **248**: 833–40.
- Gerber P, Schnell CR, Anzenberger G. (2000) Cardiovascular parameters telemetrically measured during pregnancy, parturition, and lactation in a common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Contemp Top Lab Anim Sci*; **39**: 14–7.
- Ghika J, Ghika-Schmid F, Fankhauser H, Assal G, Vingerhoets F, Albanese A, Bogousslavsky J, Favre J. (1999) Bilateral contemporaneous posteroventral pallidotomy for the treatment of Parkinson's disease: neuropsychological and neurological side effects. Report of four cases and review of the literature. *J Neurosurg. Aug*; **91**(2):313-21.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med*; **9**(5): 589-95
- Goedert M. (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*; **2**: 492–501.
- Goetz CG Stebbins, Klawans HL, Koller WC, Grossman RG, Bakay RAE, et al. (1991) United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants: presurgical, and 1- and 2-year follow-up. *Neurology*; **41**: 1719-22.
- Goetz CG, Koller WC, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, the Task Force commissioned by The Movement Disorder Society. (2002) Management of Parkinson's disease: an evidence-based review. *Mov Disord*; **17** (Suppl 4): S148-55.
- Goetz CG. (2003) Treatment of advanced Parkinson's disease: an evidence-based analysis. *Adv Neurol*; **91**: 213–28.
- Golbe LI. (1991) Young-onset Parkinson's disease: a clinical review. *Neurology*; **41**: 168–73.

- Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW. (1998) Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*; **57**: 338–42.
- Gordon G.R., Mulligan S.J. and MacVicar B.A. (2007) Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* **55**, 1214–1221.
- Grace A. (2008) Physiology of the normal and dopamine-depleted basal ganglia: insights into L-DOPA pharmacotherapy. *Mov Disord*; **23** Suppl 3:S560-9.
- Greenamyre JT, O'Brien CF. (1991) N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. *Arch Neurol*; **48**: 977–81.
- Guerrero-Cázares H, Alatorre-Carranza MP, Delgado-Rizo V, Duenas-Jiménez JM, Mendoza-Magana ML, Morales-Villagran A, et al. (2007) Dopamine release modifies intracellular calcium in tyrosine hydroxylase-transfected C6 cells. *Brain Res Bull.* **74**,113-118.
- Guridi J, Lozano AM. (1997) A brief history of pallidotomy. *Neurosurgery*. Nov;**41**(5):1169-80
- Guttman M, Burns RS, Martin WRW, Peppard RF, Adam MJ, Ruth TJ, et al. (1989) PET studies of parkinsonian patients treated with autologous adrenal implants. *Can J Neurol Sci*; **16**: 305-9.
- Halliwel B, Jenner P. (1998) Impaired clearance of oxidised proteins in neurodegenerative diseases. *Lancet*; **351**: 1510.
- Hansen JT, Kordower JH, Fiandaca MS, Klao SS, Notter MFD, Gash DM. (1988) Adrenal medullary autografts into the basal ganglia of Cebus monkeys: grafts viability and fine structure. *Exp Neurol*; **102**: 65-75.
- Hantraye, P., Varastet, M., Peschanski, M., Riche, D., Cesaro, P., Willer, J.C., Maziere, M. (1993) Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. *Neuroscience* **53**, 169–178.
- Hao G, Yao Y, Wang J, Zhang L, Viroonchatapan N, Wang ZZ. (2002) Intraestriatal grafting of glomus cells ameliorates behavioural defects of parkinsonian rats. *Physiol Behav*; **77**: 519-25.
- Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M, Gauger L, Kordower JH, et al. (1999) Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Arch Neurol*; **56**: 179-87.
- Heimer G, Bar-Gad I, Goldberg JA, Bergman H. (2002) Dopamine replacement therapy reverses abnormal synchronization of pallidal neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of parkinsonism. *J Neurosci*; **22**:7850–7855.

- Hely MA, Morris JG, Reid WG, et al. (1994) The Sydney Multicentre Study of Parkinson's disease: a randomised, prospective five year study comparing low dose bromocriptine with low dose levodopa-carbidopa. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; **57**: 903–10.
- Herrera-Marchitz M, Stromberg I, Olsson D, Ungstedt U, Olson L. (1984) Adrenal medullary implants into the dopamine denervated rat striatum: acute behaviour as a function of graft amount and location and its modulation by neuroleptics. *Brain Res*; **297**: 53–61.
- Hirsch EC, Duyckaerts C, Javoy-Agid F, Hauw JJ, Agid Y. (1990) Does adrenal graft enhance recovery of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Ann Neurol*; **27**: 676–82.
- Hoehn MM, Yahr MD. (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*; **17**: 427–42.
- Hoffer BJ, Leenders KL, Young D, Gerhardt G, Zerbe GO, Bygdeman M, et al. (1992) Eighteen-month course of two patients with grafts of fetal dopamine neurons for Parkinson's disease. *Exp Neurol*; **118**: 243–52.
- Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huettl P, Hudson J, Martin D, et al. (1994) Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett*; **182**: 107–11.
- Homann CN, Wenzel K, Suppan K, Ivanic G, Crevenna R, Ott E. (2003) Sleep attacks: facts and fiction—a critical review. *Adv Neurol*; **91**: 335–41.
- Honda Y. (1992) Respiratory and circulatory activities in carotid body resected humans. *J Appl Physiol*; **73**: 1–8.
- Horii I, Kito G, Hamada T, Jikuzono T, Kobayashi K, Hashimoto K. (2002) Development of telemetry system in the common marmoset—cardiovascular effects of astemizole and nicardipine. *J Toxicol Sci*; **27**: 123–30.
- Hurtig H, Joyce J, Sladek JR Jr, Trojanowski JQ. (1989) Postmortem analysis of adrenal medulla to caudate autograft in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol*; **25**: 607–14.
- Inazu M, Takeda H, Matsumiya T. (2003) Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *J Neurochem*. **84**: 43–52.
- Inzelberg R, Schechtman E, Paleacu D. (2002) Onset age of Parkinson disease. *Am J Med Genet*; **111**: 459–60.
- Isacson O, Deacon TW, Pakzaban P, Galpern WR, Dinsmore J, Burns LH. (1995) Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres. *Nat Med*; **11**: 1189–94.

- Jankovic J, Grossman R, Goodman C, Pirozzolo F, Schneider L, Zhu Z, et al. (1989) Clinical, biochemical and neuropathologic findings following transplantation of adrenal medulla to the caudate nucleus for treatment of Parkinson's disease. *Neurology*; **39**: 1227-34.
- Jenner, P., Rose, S., Nomoto, M., Marsden, C.D., (1986) MPTP-induced parkinsonism in the common marmoset: behavioral and biochemical effects. In: Yahr, M.D., Bergmann, K.J. (Eds.), *Parkinson's Disease*. Raven, New York, pp. 183–186.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz- González XR, et al. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*; **418**: 41-9.
- Jiao SS, Ding YJ, Zhang WC, Cao JK, Zhang GF, Zhang ZM, et al. (1989) Adrenal medullary autografts in patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med*; **321**: 324-5.
- Johnson WB., Rupe MD., Rockenstein EM., Price J., Sarty VP., Verderber LC., Mucke L. (1995) Indicator expression directed by regulatory sequences of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene: in vivo comparison of distinct GFAP-LacZ transgenes. *Glia*; **13**: 174-84.
- Juorio AV., Li X-M., Walz W., Paterson IA. (1993) Decarboxylation of L-dopa by cultured mouse astrocytes. *Brain Res*; **626**:306-09
- Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, et al. (2002) Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA*; **99**: 1580-5.
- Kelly P, Ahlskog E, Van Heerden J, Carmichael SW, Studdard SL, Bell GN. (1989) Adrenal medullary autograft transplantation into the striatum of patients with Parkinson's disease. *Mayo Clin Proc*; **64**: 282-90.
- Kelly RM, Strick PL. (2004) Macro-architecture of basal ganglia loops with the cerebral cortex: use of rabies virus to reveal multisynaptic circuits. *Prog Brain Res*; **143**:449-459.
- Kettenmann H. and Ransom B.R. (2004) *Neuroglia*. Oxford University Press, New York.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*; **418**: 50-6.
- Kish, S.J., Shannak, K., Hornykiewicz, O. (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine* **318**, 876–880.
- Koller WC, Hutton JT, Tolosa E, Capilldeo R. (1999) Immediate-release and controlled-release carbidopa/levodopa in PD: a 5-year randomized multicenter study. *Neurology*; **53**: 1012–19.

- Kopyov OV, Jacques DS, Lieberman A, Duma CM, Rogers RL. (1997) Outcome following intraestriatal fetal mesencephalic grafts for Parkinson's patients is directly related to the volume of grafted tissue. *Exp Neurol*; **146**: 536-45.
- Kordower JH, Fiandaca MS, Notter MFD, Hansen JT, Gash DM. (1990) NGF-like trophic support from peripheral nerve for grafted rhesus adrenal chromaffin cells. *J Neurosurg*; **73**: 418-28.
- Kordower JH, Cochran E, Penn RD, Goetz CG. (1991) Putative chromaffin cell survival and enhanced host-derived TH-fiber innervation following a functional adrenal medulla autograft for Parkinson's disease. *Ann Neurol*; **29**: 405-12.
- Kordower JH, Palfi S, Chen EY, Ma SY, Sendera T, Cochran EJ, Mufson EJ, Penn R, Goetz CG and Comella CD. (1999) Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol*; **46**: 419-424.
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med*. May; **14**(5): 504-6.
- Lai BC, Schulzer M, Marion S, Teschke K, Tsui JK. (2003) The prevalence of Parkinson's disease in British Columbia, Canada, estimated by using drug tracer methodology. *Parkinsonism Relat Disord*; **9**: 233-38.
- Laitinen LV, Bergenheim AT, Hariz MI. (1992) Ventroposterolateral pallidotomy can abolish all parkinsonian symptoms. *Stereotact Funct Neurosurg*; **58**(1-4): 14-21.
- Langston JW., Ballard P., Tetrud, JW., Irwin, I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, 979-980.
- Langston, JW, Irwin, I., Langston, E.B. (1984) A comparison of the acute and chronic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in humans and the squirrel monkey. *Neurology* **34** (Suppl. 1), 268.
- Langston JW, Widner H, Goetz CG, Brooks D, Fahn S, Freeman T, et al. (1992) Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT). *Mov Disord*; **7**: 2-13.
- Leblois A, Boraud T, Meissner W, et al. (2006) Competition between feedback loops underlies normal and pathological dynamics in the basal ganglia. *J Neurosci*; **26**:3567-3583.
- Leitner ML, Wang LH, Osborne PA, Golden JP, Milbrandt J, Johnson EM Jr. (2005) Expression and function of GDNF family ligands and receptors in the carotid body. *Exp Neurol*; **191** (Suppl 1): S68-79.
- Leone P, McPhee WJ, Janson CG, Davidson BL, Freese A, During MJ. (2000) Multi-site partitioned delivery of human tyrosine hydroxylase gene with phenotypic recovery in Parkinsonian rats. *Neuroreport*; **11**: 1145-51.

- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehnrcrona S, Björklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P. (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med*. May; **14** (5): 501-3
- Lie DC, Dzieluzapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. (2002) The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci*. Aug 1; **22**(15):6639-49.
- Lieberman A, Ransohoff J, Berczeller P, Brous P, Eng K, Goldstein M, et al. (1989) Adrenal medullary transplants as a treatment for advanced Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*; **80** (Supl. 126): 189-96.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*; **260**: 1130-2.
- Lindvall O, Backlund EO, Farde L, Sedvall G, Freedman R, Hoffer BJ, et al. (1987) Transplantation for Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann Neurol*; **22**: 457-68.
- Lindvall O, Rehnrcrona S, Brundin P, Gustavii B, Åstedt B, Widner H, et al. (1989) Human fetal dopamine neurons grafted into striatum in two patients with severe Parkinson's disease: a detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol*; **46**: 615-31.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnrcrona S, Gustavii B, Frackowiak R, et al. (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survives and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*; **247**: 574-7.
- Lindvall O, Widner H, Rehnrcrona S, Brundin P, Odin P, Gustavii B, et al. (1992) Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol*; **31**: 155-65.
- Lindvall O, Sawle G, Widner H, Rothwell JC, Björklund A, Brundin P, et al. (1994) Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol*; **35**: 172-80.
- López-Barneo J, López-López JR, Ureña J, González C. (1988) Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science*; **241**: 580-2.
- López-Lozano JJ, Brera B, Abascal J, Bravo G. (1989) Preparation of adrenal medullary tissue for transplantation in Parkinson's disease: a new procedure. *J Neurosurg*; **71**: 452-4.
- López-Lozano JJ, Bravo G, Abascal J, CPH Neural Transplantation Group. (1990) A long-term study of Parkinson's patients subjected to autoimplants of perfused adrenal medulla into the caudate nucleus. *Transplant Proc*; **22**: 2243-6.

- López-Lozano JJ, Bravo G, Abascal J, CPH Neural Transplantation Group. (1991) Grafting of perfused adrenal medullary tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *J Neurosurg*; **75**: 234-43.
- López-Lozano JJ, Bravo G, Brera B, Dargallo J, Salmean J, Uria J, et al. (1997) Long-term improvement in patients with severe Parkinson's disease after implantation of fetal ventral mesencephalic tissue in a cavity of the caudate nucleus: 5-year follow-up in 10 patients. *J Neurosurg*; **86**: 931-42.
- López-Lozano JJ, Mata M, Bravo G, Grupo de Trasplantes Neurales de la Clínica Puerta de Hierro. (2000) Trasplantes neurales en la enfermedad de Parkinson: experiencia de la Clínica Puerta de Hierro y estado actual. *Neurología*; **15** (Supl 5): 62-79.
- Love S, Plaha P, Patel NK, Hotton GR, Brooks DJ and Gill SS. (2005) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. *Nat Med*; **11**: 703-704.
- Lozano AM. (2003) Surgery for Parkinson's disease, the five W's: why, who, what, where, and when. *Adv Neurol*; **91**: 303-7.
- Luquin MR, Scipioni O, Vaamonde J, Gershanik O, Obeso JA. (1992) Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: clinical and pharmacological classification. *Mov Disord*; **7**: 117-24.
- Luquin MR, Montoro RJ, Guillen J, Saldise L, Insausti R, Del Río J, et al. (1999) Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron*; **22**: 743-50.
- Madrazo I, Drucker-Colin R, Díaz V, Martínez-Mata J, Torres C, Becerril J. (1987) Open microsurgical autograft of the adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med*; **316**: 831-4.
- Madrazo I, Franco-Bourland R, Ostrosky-Solís F, Aguilera M, Cuevas C, Álvarez F, et al. (1990a) Neural transplantation (auto-adrenal, fetal nigral and fetal adrenal) in Parkinson's disease: the Mexican experience. *Prog Brain Res*; **82**: 593-602.
- Madrazo I, Franco-Bourland R, Ostrosky-Solís F, Aguilera M, Cuevas C, Zamorano C, et al. (1990b) Fetal homotransplants (ventral mesencephalon and adrenal tissue) to the striatum of parkinsonian subjects. *Arch Neurol*; **47**: 1281-5.
- Marden CD. (1982) The mysterious motor functions of the basal ganglia. *Neurology*; **32**: 514-539.
- Maswood N, Grondin R, Zhang Z, Stanford JA, Surgener SP, Gash DM and Gerhardt GA. (2002). Effects of chronic intraputaminial infusion of glial line-derived neurotrophic factor (GDNF) in aged Rhesus monkeys. *Neurobiol aging*; **23**: 881-889.
- McGeer PL, McGeer EG, Suzuki JS. (1977) Aging and extrapyramidal function. *Arch Neurol*; **34**: 33-35.

- McGregor KH, Gil J, Lahiri S. A morphometric (1984) Study of the carotid body in chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol*; **57**: 1430-8.
- McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. (2001) Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*; **2**: 589- 94.
- Mehlman PT, Westergaard GC, Hoos BJ, Sallee FR, Marsh S, Suomi SJ, et al. (2000) CSF5 HIAA and nighttime activity in free-ranging primates. *Neuropsychopharmacology*; **22**: 210-8.
- Mendez I, Viñuela A, Astradsson A, Mukhida K, Hallett P, Robertson H, Tierney T, Holness R, Dagher A, Trojanowski JQ, Isacson O. (2008) Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med*. May; **14**(5):507-9
- Meyer AK, Maisel M, Hermann A, Stirl K, Storch A. (2009) Restorative approaches in Parkinson's Disease: Which cell type wins the race?. *J Neurol Sci*. 2009 Sep 3.
- Mínguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F. (2005) Terapia celular y otras estrategias neuroregenerativas en la enfermedad de Parkinson (II). *Rev Neurol* 2005; **41**: 684-93
- Mink JW, Thach WT. (1991) Basal ganglia motor control, III: pallidal ablation: normal reaction time, muscle cocontraction, and slow movement. *J Neurophysiol*.; **65**: 330-351.
- Mizuno Y, Sone N, Suzuki K, Saitoh T. (1988) Studies on the toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) against mitochondria of mouse brain. *J. Neurol. Sci* **86**: 97-110.
- Montgomery EB. (2007) Basal ganglia physiology and pathophysiology: a reappraisal. *Parkinsonism Relat Disord*; **13**: 455-465.
- Morens DM, Grandinetti A, Reed D, White LR, Ross GW. (1995) Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology*; **45**: 1041-51.
- Moris G, Vega JA. (2003) Factores neurotróficos: fundamentos para su aplicación clínica. *Neurología*; **18**: 18-28.
- Moro E, Scerrati M, Romito LM, Roselli R, Tonali P, Albanese A. (1999) Chronic subthalamic nucleus stimulation reduces medication requirements in Parkinson's disease. *Neurology*. Jul 13; **53**(1): 85-90.
- Muthane UB, Swamy HS, Satishchandra P, Subhash MN, Rao S, Subbakrishna D. (1994) Early onset Parkinson's disease: are juvenile- and young-onset different? *Mov Disord*; **9**: 539-44.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE, (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci*. **36**: 2503-2508.

- Nosrat CA, Tomac A, Lindqvist E, Lindskog S, Humpel C, Stromberg I, et al. (1996) Cellular expression of GDNF mRNA suggest multiple functions inside and outside the nervous system. *Cell Tissue Res*; **286**: 191-207.
- Nutt JG, Woodward WR, Hammerstad JP, Carter JH, Anderson JL. (1984) The “on-off” phenomenon in Parkinson’s disease: relation to levodopa absorption and transport. *N Engl J Med*; **310**: 483–88.
- Nutt JG. (2001) Motor fluctuations and dyskinesia in Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat Disord*; **8**: 101–08.
- Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr., Lozano AM, Penn RD, Simpson RK Jr., Stacy M and Wooten GF. (2003) Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*; **60**: 69-73.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, et al. (2000) Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson’s disease: problems with current model. *Ann Neurol*; **47**(suppl 1):22–32.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz M, Marin C, et al (2004) The origin of motor fluctuations in Parkinson’s disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. *Neurology*; **62**(suppl 1):S17–S30.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. (2008) Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord*; **23** Suppl 3:S548-59.
- Ohye C, Shibasaki T, Hirai T, et al. (1993) Tremor-mediating thalamic zone studied in humans and in monkeys. *Stereotact Funct Neurosurg*; **60**:136 –145.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, et al. (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson’s disease. *Ann Neurol*; **54**: 403-14.
- Olanow CW. (2004) Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci. Mar*; **1012**: 209-23.
- Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F. (2006) Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson’s disease: scientific rationale and clinical implications. *Lancet Neurol*; **5**:677– 687.
- Olson L, Backlund EO, Ebendal T, Freedman R, Hamberger B, Hanson P, et al. (1991) Intra putaminal infusion of nerve growth factor to support adrenal medullary autografts in Parkinson’s disease: one-year followup of first clinical trial. *Arch Neurol*; **48**: 373 81.
- Ostrosky-Solís F, Quintanar L, Madrazo I, Drucker-Colin R, Franco- Bourland R, León-Meza V. (1988) Neuropsychological effects of brain autograft of adrenal medullary tissue for the treatment of Parkinson’s disease. *Neurology*; **38**: 1442-50.

- Otero-Siliceo E, Abascal-Arias MR, Alanis-Quiroga M, Alonso-Vilatela ME, et al. (1996) Parkinson Enfoque al Futuro. Fondo de Cultura Económica, 1ra edición: 19-24
- Parkinson Study Group. (2000) Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a randomized controlled trial. *JAMA*; **284**: 1931–38.
- Patel NK, Bunnage M, Plaha P, Svendsen CN, Heeywood P and Gill SS. (2005) Intraputaminial infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann Neurol*; **57**: 298-302.
- Payami H, Larsen K, Bernard S, Nutt J. (1994) Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann Neurol*; **36**: 659–61.
- Penn RD, Goetz CG, Taner CM, Klawans HL, Stannon KM, Comella CL, et al. (1988) The adrenal medullary transplant operation for Parkinson's disease: clinical observations in five patients. *Neurosurgery*; **22**: 999-1004.
- Perea G. and Araque A. (2005) Glial calcium signalling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* **38**, 375–382.
- Perez Otano, I., Oset, C., Luquin, M.R., Herrero, M.T., Obeso, J.A., Del Rio, J. (1994) Mptp-induced parkinsonism in primates: pattern of striatal dopamine loss following acute and chronic administration. *Neuroscience Letters* **175**, 121–125.
- Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger Å, Olson L, Wyatt RJ. (1979) Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*; **204**: 643-7.
- Peters O., Schipke C.G., Hashimoto Y. and Kettenmann H. (2003) Different mechanisms promote astrocyte Ca²⁺ waves and spreading depression in the mouse neocortex. *Journal of Neuroscience* **23**, 9888–9896.
- Peterson DI, Price ML, Small CS. (1989) Autopsy findings in a patient who had an adrenal-to-brain transplant for Parkinson's disease. *Neurology*; **39**: 235-8.
- Piccini P, Brooks DJ, Björklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, et al. (1999) Dopamine release from nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*; **2**: 1137-40.
- Piffl, C., Schingnitz, G., Hornykiewicz, O. (1988) The neurotoxin MPTP does not reproduce in the rhesus monkey the interregional pattern of striatal dopamine loss typical of human idiopathic Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* **92**, 228–233.
- Piffl, C., Schingnitz, G., Hornykiewicz, O. (1991) Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on the regional distribution of brain monoamines in the rhesus monkey. *Neuroscience* **44**, 591–605.
- Pradhan S, Pandey N, Shashank S, Gupta RK, Mathur A. (1999) Parkinsonism due to predominant involvement of substantia nigra in Japanese encephalitis. *Neurology*; **53**: 1781–86.

- Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. (2001) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res*; **86**: 122–27.
- Rajput AH. (1992) Frequency and cause of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*; **19** (1 suppl): 103–07.
- Ransom BR, Kunis DM, Irwin I, Langston JW. (1987) Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. *Neurosci Lett*; **75**: 323–28.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE. (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N Engl J Med*; **342**: 1484–91.
- Raz, A., Vaadia, E., Bergman, H., (2000) Firing patterns and correlations of spontaneous discharge of pallidal neurons in the normal and the tremulous 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine vervet model of parkinsonism. *The Journal of Neuroscience* **20**, 8559–8571.
- Redmond DE, Sladek JR Jr, Roth RH, Collier TJ, Elsworth JD, Deutch AY, et al. (1986) Fetal neuronal grafts in monkeys given methyl-phenyltetrahydro- pyridine. *Lancet*; **1**: 1125-7.
- Redmond DE Jr, Bjugstad KB, Teng YD, Ourednik V, Ourednik J, Wakeman DR, Parsons XH, Gonzalez R, Blanchard BC, Kim SU, Gu Z, Lipton SA, Markakis EA, Roth RH, Elsworth JD, Sladek JR Jr, Sidman RL, Snyder EY. (2007) Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 17; **104**(29):12175-80.
- Reis J, Swayne OB, Vandermeeren Y, et al. (2008) Contribution of transcranial magnetic stimulation to the understanding of cortical mechanisms involved in motor control. *J Physiol*; **586**:325–351.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*. Dec; **20**(12):570-7.
- Rivlin-Etzion M, Marmor O, Saban G, et al. (2008) Low-pass filter properties of basal ganglia cortical muscle loops in the normal and MPTP primate model of parkinsonism. *J Neurosci*; **28**:633– 649.
- Robinson EL, Demaria-Pesce VH, Fuller CA. (1993) Circadian rhythms of thermoregulation in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Am J Physiol*; **265**:781–5.
- Rodríguez MC, Guridi J, Mewes, et al. (1998) The subthalamic nucleus and tremor in Parkinson's disease. *Mov Dis*; **13**(suppl 1):111–118.
- Roeltgen, D.P., Schneider, J.S. (1994) Task persistence and learning ability in normal and chronic low dose MPTP-treated monkeys. *Behavioural Brain Research* **60**, 115–124.

- Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, et al. (2000) Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA*; **283**: 2674–79.
- Rothwell JC, Obeso JA, Traub MM, Marsden CD. (1983) The behavior of the long-latency stretch reflex in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; **46**: 35–44.
- Rubchinsky LL, Kopell N, Sigvardt KA. (2003) Modeling facilitation and inhibition of competing motor programs in basal ganglia subthalamic nucleus-pallidopamine circuits. *Proc Natl Acad Sci USA*; **100**:14427–14432.
- Russ H, Staust K, Martel F, Gliese M, Schomig E. (1996) The extraneuronal transporter of monoamine transmitters exist in cells derived from human central nervous system glia. *Eur. J. Neurosci.* **8**: 1256-1264
- Samii A, Calne DB. (1999) Research into the etiology of Parkinson's disease. In: Oertel W, LeWitt PA, eds. *Parkinson's disease: the treatment options*. London: Martin Dunitz Publishers: 229–43.
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR. (2004) Parkinson's disease. *Lancet*; **363**: 1783–93
- Sánchez-Pernaute R, Studer L, Bankiewicz KS, Major EO, McKay RDG. (2001) In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J Neurosci Res*; **65**: 284-8.
- Santiago-López D., Rivas-Arancibia S. (2008) Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Rev Fac Med UNAM*; **51** (3) Mayo-Junio:104-107
- Schneider, J.S. (1990) Chronic exposure to low doses of MPTP. II. Neurochemical and pathological consequences in cognitively-impaired, motor asymptomatic monkeys. *Brain Research* **534**, 25–36.
- Schneider, J.S., Kovelowski II, C.J. (1990) Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. *Brain Research* **519**, 122–128.
- Schneider, J.S., Roeltgen, D.P. (1993) Delayed matching-to-sample, object retrieval, and discrimination reversal deficits in chronic low dose MPTP treated monkeys. *Brain Research* **615**, 351–354.
- Schneider, J.S., Pope Coleman, A. (1995) Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey. *Neurodegeneration* **4**, 245–255.
- Schrag A, Ben-Shlomo Y, Brown R, Marsden CD, Quinn N. (1998) Young-onset Parkinson's disease revisited—clinical features, natural history, and mortality. *Mov Disord*; **13**: 885–94.

- Schultz, W., Studer, A., Jonsson, G., Sundstrom, E., Mefford, I., (1985) Deficits in behavioral initiation and execution processes in monkeys with 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism. *Neuroscience Letters* **59**, 225–232.
- Schultz, W., Romo, R., Scarnati, E., Sundstrom, E., Jonsson, G., Studer, A., (1989a) Saccadic reaction times, eye-arm coordination and spontaneous eye movements in normal and MPTP-treated monkeys. *Experimental Brain Research* **78**, 253–267.
- Schultz, W., Studer, A., Romo, R., Sundstrom, E., Jonsson, G., Scarnati, E., (1989b) Deficits in reaction times and movement times as correlates of hypokinesia in monkeys with MPTP-induced striatal dopamine depletion. *Journal of Neurophysiology* **61**, 651–668.
- Schumacher JM, Elias SA, Palmer EP, Kott HS, Dinsmore J, Dempsey PK, et al. (2000) Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with Parkinson's disease. *Neurology*; **54**; 1042-9.
- Schuurman PR, Bosch DA, Bossuyt PM, Bonsel GJ, van Someren EJ, de Bie RM, et al. (2000) A comparison of continuous thalamic stimulation and thalamotomy for suppression of severe tremor. *N Engl J Med*. Feb 17;**342** (7):461-8.
- Segovia J, Vergara P, and Brenner M. (1998a) Differentiation-dependent expression of transgenes in engineered astrocyte cell lines. *Neurosci Lett*: **242**: 172-176.
- Segovia, J., P. Vergara, et al. (1998b) Astrocyte-specific expression of tyrosine hydroxylase after intracerebral gene transfer induces behavioral recovery in experimental parkinsonism. *Gene Ther* **5**(12): 1650-5.
- Seifert G. and Steinhäuser C. (2001) Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. *Progress in Brain Research* **132**, 287–299.
- Seifert G., Schilling K. and Steinhäuser C. (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience* **7**, 194–206.
- Shen Y, Muramatsu SI, Ikeguchi K, Fujimoto KI, Fan DS, Ogawa M, et al. (2000) Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther*; **11**: 1509-19.
- Shukla S, Agrawal AK, Chaturvedi RK, Seth K, Srivastava N, Sinha C, et al. (2004) Co-transplantation of carotid body and ventral mesencephalic cells as an alternative approach towards functional restoration in 6-hydroxydopamine-lesioned rats: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*; **91**: 274-84.
- Sladek JR, Redmond DE, Collier TJ, Haber SN, Elsworth JD, Deutch AY, et al. (1987) Transplantation of fetal dopamine neurons in primate brain reverses MPTP induced parkinsonism. *Prog Brain Res*; **71**: 309-22.

- Slovin, H., Abeles, M., Vaadia, E., Haalman, I., Prut, Y., Bergman, H. (1999) Frontal cognitive impairments and saccadic deficits in low-dose MPTP-treated monkeys. *Journal of Neurophysiology* **81**, 858–874.
- Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. (2005) The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. Mar 24; **134**(1):57-66. Review.
- Song, D.D., Haber, S.N. (2000) Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. *Journal of Neuroscience* **20**, 5102–5114.
- Spencer DD, Robbins RJ, Naftolin F, Marek KL, Vollmer T, Leranth C, et al. (1992) Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med*; **327**: 1541-8.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 26; **95** (11): 6469-73.
- Steece-Collier K, Maries E, Kordower JH. (2002) Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited. *Proc Natl Acad Sci USA*; **99**: 13972–74.
- Stern, Y., Langston, J.W. (1985) Intellectual changes in patients with MPTP-induced parkinsonism. *Neurology* **35**, 1506–1509.
- Stern, Y., Tetrad, J.W., Martin, W.R., Kutner, S.J., Langston, J.W. (1990) Cognitive change following MPTP exposure. *Neurology* **40**, 261–264.
- Stocchi F, Olanow CW. (2003) Neuroprotection in Parkinson's disease: clinical trials. *Ann Neurol*; **53** (Suppl 3): S87-99.
- Stocchi F, Vacca L, Ruggieri S, Olanow CW. (2005) Infusion of levodopa methyl ester in patients with advanced PD: a clinical and pharmacokinetic study. *Arch Neurol*; **62**:905–910.
- Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsh A, et al. (2001) Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol*; **170**: 317-25.
- Strecker RE, Sharp T, Brundin P, Zetterström T, Ungerstedt U, Björklund A. (1987) Autoregulation of dopamine release and metabolism by intrastriatal nigral grafts as revealed by intracerebral dialysis. *Neuroscience*; **22**: 169-78.
- Strömberg I, Herrera-Marschitz M, Ungerstedt U, Ebendal T, Olson L. (1985) Chronic implants of chromaffin tissue into the dopamine-denervated striatum: effects of NGF on graft survival, fiber growth and rotation behaviour. *Exp Brain Res*; **60**: 335-49.
- Studer L, Tabar V, McKay RDG. (1998) Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci*; **1**: 290-5.

- Subramanian T, Marchionini D, Potter EM, Cornfeldt ML. (2002) Striatal xenotransplantation of human retinal pigment epithelial cells attached to microcarriers in hemiparkinsonian rats ameliorates behavioural deficits without provoking a host immune response. *Cell Transplant*; **11**: 207-14.
- Suzuki K, Mizuno Y, Yoshida M. (1990) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-like compounds on mitochondrial respiration. *Adv. Neurol.* **53**: 215-218.
- Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, Morizane A, Hayashi T, Kishi Y, et al. (2005) Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest*; **115**: 102-9.
- Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, et al. (1999) Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA*; **281**: 341–46.
- Taylor JR, Elsworth JD, Sladek Jr JR, Collier TJ, Roth RH, Redmond Jr DE. (1995) Sham surgery does not ameliorate MPTP-induced behavioral deficits in monkeys. *Cell Transpl*; **4**(1 (January–February)):13–26.
- Taylor JR, Elsworth JD, Roth RH, Sladek JR Jr and Redmond DE Jr. (1997) Severe long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops sabaesus*). *Neuroscience*; **81**: 745–755.
- Thase ME. (1998) Effects of venlafaxine on blood pressure: a meta-analysis of original data from 3744 depressed patients. *J Clin Psychiatry*; **59**: 502–08.
- Toledo-Aral JJ, Méndez-Ferrer S, Pardal R, López-Barneo J. (2002) Dopaminergic cells of the carotid body: physiological significance and possible therapeutic applications in Parkinson's disease. *Brain Res Bull*; **57**: 847-53.
- Toledo-Aral JJ, Méndez-Ferrer S, Pardal R, Echevarría M, López- Barneo J. (2003) Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body grafted parkinsonian rats. *J Neurosci*; **23**: 141-8.
- Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, et al. (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*; **373**: 335 9.
- Trejo, F., P. Vergara, et al. (1999a) Gene therapy in a rodent model of Parkinson's disease using differentiated C6 cells expressing a GFAP-tyrosine hydroxylase transgene. *Life Sci* **65**(5): 483-91.
- Trejo F, Vergara P, Brenner M, and Segovia J. (1999b) Biosynthetic capacity of C6 cells engineered with a glial fibrillary acidic protein-tyrosine hydroxylase transgene. *Med Sci Res*; **27**: 423-425.
- Tsui JK, Calne DB, Wang Y, Schulzer M, Marion SA. (1999) Occupational risk factors in Parkinson's disease. *Can J Public Health*; **90**: 334–37.

- Ureña J, Fernández-Chacón R, Benot A, Álvarez de Toledo G, López-Barneo J. (1994) Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; **91**: 10208-11.
- van Dyck CH, Seibyl JP, Malison RT, et al. (2002) Age-related decline in dopamine transporters: analysis of striatal subregions, nonlinear effects, and hemispheric asymmetries. *Am J Geriatr Psychiatry*; **10**: 36–43.
- Verhagen Metman L, Del Dotto P, van den Munckhof P, Fang J, Mouradian MM, Chase TN. (1998) Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology*; **50**: 1323–26.
- Villadiego J, Méndez-Ferrer S, Valdés-Sánchez T, Silos-Santiago I, Fariñas I, López-Barneo J, et al. (2005) Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells in situ and after intrastriatal transplantation. *J Neurosci* **25**: 4091-8.
- Volkman J, Sturm V, Weiss P, Kappler J, Voges J, Koulousakis A, Lehrke R, Heffer H, Freund HJ. (1998) Bilateral high-frequency stimulation of the internal globus pallidus in advanced Parkinson's disease. *Ann Neurol*. Dec;**44**(6):953-61.
- Wakabayashi K, Takahashi H. (1997) Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur Neurol*; **38** (suppl 2): 2–7.
- Walczak P, Chen N, Hudson JE, Willing AE, Garbuzova-Davis SN, Song S, et al. (2004) Do hematopoietic cells exposed to a neurogenic environment mimic properties of endogenous neural precursors? *J Neurosci Res*; **76**: 244-54.
- Waters C, Itabashi HH, Apuzzo MLJ, Weiner LP. (1990) Adrenal to caudate transplantation: a post-mortem study. *Mov Disord*; **5**: 248-50.
- Watts RL, Mandir A, Bakay RAE. (1995) Intrastriatal cogafts of autologous adrenal medulla and sural nerve in MPTP-induced parkinsonian macaques: behavioural and anatomical assessment. *Cell Transplant*; **4**: 27-38.
- Watts RL, Raiser CD, Stover NP, Cornfeldt ML, Schweikert AW, Allen RC, et al. (2003) Stereotaxic intraestriatal implantation of human retinal pigment epithelial cells attached to gelatine microcarriers: a potential new cell therapy for Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*; **65**: 215-27.
- Waxman MJ, Morantz RA, Koller WC, Paone DB, Nelson PW. (1991) High incidence of cardiopulmonary complications associated with implantation of adrenal medullary tissue into the caudate nucleus in patients with advanced neurologic disease. *Crit Care Med*; **19**: 181-6.
- Wilms, H., Sievers, J., Deuschl, G., (1999) Animal models of tremor. *Movement Disorders* **14**, 557–571.
- Winkler C, Sauer H, Lee CS, Bjorklund A. (1996) Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*; **16**: 7206-15.

Yamada T, Yamanaka I, Takahashi H, Nakajima K. (1996) Invasion of brain by neurovirulent influenza A virus after intranasal inoculation. *Parkinsonism Relat Disord*; **2**: 187–93.