



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROBENECID SOBRE
EL PARKINSONISMO Y LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR
LEVODOPA EN UN MODELO DE
HEMIPARKINSONISMO EN RATAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

KARLA VILLASEÑOR AGUAYO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. PAUL CARRILLO MORA
2014

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno Villaseñor Aguayo Karla 044 55 12898271 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 305175980
2. Datos del tutor Dr. Paul Carrillo Mora
3. Datos del sinodal 1 Dr. José Pedraza Chaverri
4. Datos del sinodal 2 Dra. Ma. Rosa de Lourdes Avila Costa
5. Datos del sinodal 3 Dra. Liliana Carmona Aparicio
6. Datos del sinodal 4 Dra. Verónica Pérez de la Cruz
7. Datos del trabajo escrito Efecto de la administración de Probenecid sobre el parkinsonismo y las discinesias inducida por Levodopa en un modelo de hemiparkinsonismo en ratas. 69p 2014

Esta tesis se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía bajo la dirección del Dr. Paul Carrillo Mora.

Agradecimientos

- Mi más grande agradecimiento al Dr. Paul Carrillo por guiarme en este camino, por todas sus enseñanzas, su paciencia y el apoyo que me brindó en todo momento. Y porque además de ser un gran tutor, es un gran amigo. ¡Muchas gracias Paul!
- A la Dra. Ma. Rosa Avila Costa y a la Dra. Liliana Carmona Aparicio por sus importantes comentarios y aportaciones al presente trabajo.
- A la Dra. Verónica Pérez por sus enseñanzas y todo el apoyo que me brindó de principio a fin. Por brindarme un espacio y material de trabajo dentro de su laboratorio. Y por todos los buenos momentos que compartimos. ¡Muchas gracias Vero!
- Al Dr. José Pedraza por su apoyo durante la elaboración de esta tesis.
- A la Dra. Teresa Fortoul van der Goes y a la Dra. Adriana E. González Villalba del Depto. de Biología Celular y Tisular de Facultad de Medicina de la U.N.A.M por su apoyo durante la elaboración de esta tesis.
- Al personal del bioterio de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.:
M.V.Z. Enrique Pinzón Estrada
M.V.Z. Victor Manuel Salgado Alfaro
M.V.Z. Ismael Torres Saldaña.
- A todos mis compañeros del laboratorio que se convirtieron en grandes amigos y compañeros de aventuras. Gracias por todo el apoyo académico, técnico y moral que me brindaron durante la realización de esta tesis: Rafael Lugo, Perla Muñoz, Tonali Blanco, Daniela Silva, Jazmin Reyes, Gustavo Vázquez y Daniela Ramírez. ¡Los quiero con todo mi corazón!

CONTENIDO

1.	ABREVIATURAS	7
2.	RESUMEN.....	8
3.	ANTECEDENTES.....	9
3.1.	ENFERMEDAD DE PARKINSON.	9
3.1.1.	<i>Características clínicas</i>	9
3.1.2.	<i>Epidemiología</i>	10
3.1.3.	<i>Cambios anatómicos y morfológicos</i>	11
3.2.	ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.....	15
3.2.1.	<i>Factores de riesgo</i>	15
3.2.2.	<i>Etiología</i>	15
3.3.	FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.	17
3.4.	TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.	19
3.5.	COMPLICACIONES DEL TRATAMIENTO CON LEVODOPA.	21
3.6.	FISIOPATOLOGÍA DE LAS DSC INDUCIDAS POR LEVODOPA.	22
3.7.	GLUTAMATO Y DISCINESIAS INDUCIDAS POR LEVODOPA.	24
3.8.	TRATAMIENTO DE LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE LEVODOPA.	25
3.9.	VÍA DE LA KINURENINA Y EL ÁCIDO KINURÉNICO.....	26
3.10.	MANIPULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA VÍA DE LA KINURENINA.	29
3.11.	PROBENECID.....	30
3.12.	KINURENINAS Y ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	30
3.13.	MODELO DE PARKINSONISMO INDUCIDO POR LA TÓXINA 6-HIDROXIDOPAMINA.....	31
4.	JUSTIFICACIÓN.	33
5.	HIPÓTESIS.....	33
6.	OBJETIVO GENERAL.	33
7.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
8.	MÉTODOS.....	34
8.1.	LESIÓN EN HAZ PROSCENCEFÁLICO MEDIAL CON 6-OHDA.....	35
8.2.	EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA DE GIRO.	36
8.3.	EVALUACIÓN CONDUCTUAL DEL HEMIPARKINSONISMO.	37
8.4.	ADMINISTRACIÓN DE LEVODOPA/CARBIDOPA V.O. PARA EL DESARROLLO DE DISCINESIAS.	40
8.5.	EVALUACIÓN DE LAS DISCINESIAS MOTORAS.....	40
8.7.	EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA DE GIRO INDUCIDA POR L-DOPA.	42
8.8.	EVALUACIÓN DEL CONTENIDO ESTRIATAL TOTAL DE ÁCIDO KINURÉNICO POR HPLC.	42
8.9.	DETERMINACIÓN DE ÁCIDO KINURÉNICO POR HPLC.	43
9.	RESULTADOS.....	43
9.1.	EVALUACIÓN CONDUCTUAL DEL EFECTO ANTIPARKINSÓNICO DE LOS FÁRMACOS.	43
9.1.1.	<i>Prueba de ajuste de pasos</i>	43
9.1.2.	<i>Prueba de cilindro</i>	45
9.1.3.	<i>Monitor de actividad espontánea</i>	47
9.2.	EVALUACIÓN CONDUCTUAL DEL EFECTO ANTIDISCINÉTICO DE LOS FÁRMACOS.....	48
9.2.1.	<i>Discinesias</i>	48

9.2.2.	<i>Conducta de giro inducida por levodopa</i>	51
9.2.3.	<i>Perfil temporal de la conducta de giro</i>	51
9.3.	DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ÁCIDO KINURÉNICO POR HPLC.	52
10.	DISCUSIÓN.....	54
11.	CONCLUSIÓN.....	61
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1. Abreviaturas.

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
AMA	Amantadina
BHE	Barrera hemato-encefálica
CL	Cuerpos de Lewy
COMT	Catecol O-metiltransferasa
DA	Dopamina
DSC	Discinesias
DIL	Discinesias inducidas por L-DOPA
EP	Enfermedad de Parkinson
GPi	Globo pálido interno
GPe	Globo pálido externo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPM	Haz prosencefálico medial
KYNA	Ácido kinurénico
L-DOPA	Levodopa
L-KYN	L-kinurenina
MAO-B	Mmonoamino oxidasa B
NAD ⁺	Nnicotinamida adenín dinucleótido
NMDA	N-metil-D-aspartato
NST	Núcleo subtalámico
O ₂ ^{•-}	Superóxido
•OH	Hidroxilo
PROB	Probenecid
QUIN	Ácido quinolínico
rNMDA	Receptor NMDA
SNC	Sistema nervioso central
SNc	Sustancia negra en su parte compacta
VK	Vía de la kinurenina

2. Resumen.

La levodopa (L-DOPA) es el tratamiento más eficaz para el manejo de la enfermedad de Parkinson, sin embargo, su uso prolongado se relaciona con el desarrollo de discinesias (DSC). Diversos fármacos se han utilizado para el control de las DSC, entre ellos antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) y en especial la amantadina (AMA), que es uno de los más eficaces. El ácido kinurénico (KYNA) es un metabolito del triptófano y es el único antagonista endógeno del NMDA que se conoce. Previamente se demostró que es posible aumentar los niveles cerebrales de KYNA con la administración de Probenecid (PROB). Sin embargo, los efectos del PROB sobre el parkinsonismo o las DSC no se han estudiado. **Objetivo:** Se comparó el efecto de AMA y L-DOPA con el de PROB. Se evaluó el posible efecto antiparkinsonico y antidiscinético de la administración de PROB y se buscó su asociación con los niveles estriatales de KYNA. **Métodos.** Se utilizaron ratas Wistar macho (260-280 g) y se formaron los siguientes grupos (n=5-6), en dos fases. Fase I. **EFFECTOS ANTIPARKINSÓNICOS:** 1) Control (lesión con solución salina, 3 μ L en el haz prosencefálico medial (HPM) derecho; 2) Lesión c/ 6-hidroxidopamina (6-OHDA 20 μ g/3 μ L) en el HPM derecho. Posteriormente, los animales lesionados con 6-OHDA se dividieron de forma aleatoria en 4 grupos: a) Control sin fármacos; 2) L-DOPA (25 mg/Kg) v.o.; 3) AMA (40 mg/kg) v.o.; y 4) PROB 75 mg/Kg i.p. Todos recibieron una sola dosis del fármaco y 1 h después se evaluaron con: prueba de cilindro, ajuste de pasos y monitor de actividad espontánea. Fase II. **EFFECTOS ANTIDISCINÉTICOS:** los animales parkinsonicos recibieron L-DOPA 25 mg/Kg v.o. diariamente hasta el desarrollo de DSC (14-21 días), y éstas se evaluaron mediante la escala propuesta por Cenci et al, 1998, y se evaluó la conducta de giro antes de la dosis de L-DOPA (basal), en el pico de dosis de L-DOPA (30-45 min), y después de la administración de AMA o PROB. **Resultados:** Efecto antiparkinsonico: los animales que recibieron algún tratamiento (L-DOPA, PROB, AMA) presentaron mejoría significativa en su asimetría motora en comparación con los controles, siendo la L-DOPA y el PROB los que presentaron el mayor efecto antiparkinsonico. DSC: el uso de AMA o PROB redujeron significativamente la severidad de las DSC, sin embargo, el efecto es mayor con el uso de PROB. Por otro lado, no se observó aumento significativo en los niveles de KYNA después del uso L-DOPA, AMA, L-DOPA+PROB ni L-DOPA+AMA, sin embargo, el PROB aumenta por si solo los niveles de KYNA así como después de la lesión con 6-OHDA. **Conclusión:** El presente estudio demuestra por primera vez los efectos positivos significativos del PROB sobre el parkinsonismo y las DSC inducidas por L-DOPA. La falta de asociación de los niveles de KYNA con el efecto antidiscinético sugiere que el PROB pudiera actuar por mecanismos alternos al aumento del KYNA.

3. Antecedentes.

3.1. Enfermedad de Parkinson.

3.1.1. Características clínicas.

La Enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita originalmente por James Parkinson en 1817 (Jankovic, 2008). Esta enfermedad se caracteriza clínicamente por la presencia de temblor de reposo, lentitud en los movimientos voluntarios (bradicinesia), rigidez muscular, disminución de las expresiones faciales (hipomimia) y alteración de los reflejos posturales (Fabbrini *et al.*, 2007).

En etapas muy tempranas de la enfermedad, se han descrito síntomas prodrómicos como la fatiga, el dolor muscular, distonías y rigidez muscular, sin embargo, todos estos síntomas son inespecíficos y pueden o no estar asociados con el padecimiento (Rajput *et al.*, 2008). Las distonías unilaterales pueden presentarse especialmente en los pies junto con una sensación de rigidez, “arrastre de los pies” o tropiezos frecuentes, ojo seco debido a la disminución en la frecuencia del parpadeo, reducción en las habilidades de escritura, sensación de “temblor interno” e incluso el síndrome de piernas inquietas que se puede presentar hasta 12 años antes de inicio de los síntomas claros de la enfermedad (Rajput *et al.*, 2008).

Además de los síntomas cardinales motores, se presentan diversos síntomas no motores como alteraciones en el sueño, especialmente en la fase de Movimientos Oculares Rápidos (Olson *et al.*, 2000), estreñimiento, dermatitis seborreica, disminución de la función olfatoria y vesical, etc. (Samii, 2008). Existen también modificaciones cognitivo-conductuales que provocan cambios de personalidad, dificultad para concentrarse, cambios de humor, depresión, ansiedad, déficit en el reconocimiento de objetos o personas, discapacidad en la ejecución de tareas y en la planeación de trabajos y lentitud en el procesamiento general de información (Dubois *et al.*, 1997).

A pesar de que los síntomas motores se asocian a distintos grados de alteraciones cognitivas, neuropsiquiátricas y/o disfunción autonómica (Jankovic, 2008), las alteraciones más importantes y discapacitantes en estos pacientes son sin duda las alteraciones motoras. El 70% de los pacientes notan el temblor como primer síntoma, seguido de la rigidez, sin embargo, la rigidez también puede presentarse de forma aislada (formas rígido-acinéticas). La bradicinesia no suele ser tan notoria como el temblor o la rigidez, sin embargo, es la alteración motora más discapacitante debido a que paulatinamente se reducen o inhiben por completo (akinesia) los movimientos voluntarios (Samii, 2008).

3.1.2. Epidemiología.

La EP es una enfermedad neurodegenerativa relacionada con la edad; comúnmente afecta a personas que superan los 60 años de edad y solo del 4% al 10% de los pacientes presentan el inicio de la enfermedad antes de los 40 años (Rajput *et al.*, 2008). Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en el mundo (Olanow *et al.*, 2009) y se estima que tiene una prevalencia de 115 casos por cada 100,000 habitantes y una incidencia anual de 13.5 a 13.9 casos por cada 100,000 personas a nivel mundial (Schapira, 2009). Sin embargo, estos datos varían mucho entre las diferentes regiones geográficas, por ejemplo, en África se estima una incidencia de 4.5 casos por cada 100,000 habitantes; en Londres, el estimado es de 26 casos por cada 100,000 hab; y en ciudades como Finlandia o Nueva York la incidencia reportada es de 17 casos por cada 100,000 habitantes (Rajput *et al.*, 2008).

En México no se cuenta con estadísticas confiables que señalen la incidencia y prevalencia precisa de la EP, sin embargo, según la Secretaría de Salud existen al menos 500,000 pacientes con la enfermedad hasta el año de 2006 (Programa Específico de Parkinson 2001-2006).

En cuanto a la prevalencia mundial de la enfermedad, ésta ha aumentado con el paso de los años debido a que anteriormente resultaba más complicado diagnosticarla, y a que en los informes de los decesos se solía excluir esta condición, además el desarrollo de tratamientos y el acceso a éstos ha mejorado la calidad de vida de los pacientes dándoles una mayor expectativa de vida (Rajput *et al.*, 2008). Por otro lado, se estima que con el constante incremento en la expectativa de vida a nivel mundial se incrementa también la incidencia de la EP, así como de otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad (Olanow *et al.*, 2009).

La EP en sí misma no produce la muerte, sin embargo, genera complicaciones en la salud así como discapacidades físicas que predisponen al paciente a tener una expectativa de vida de 35% a 65% más baja que una persona sin la enfermedad. Desde luego estas cifras también pueden variar entre países en relación a las condiciones socioeconómicas, el modo de vida, y desarrollo en el cuidado de la salud (Rajput *et al.*, 2008).

3.1.3. Cambios anatómicos y morfológicos.

La alteración patológica característica de la EP es la presencia de unos cuerpos de inclusión intraneuronales llamados cuerpos de Lewy (CL; Crosby *et al.*, 2008). Los CL están compuestos por un material granular y filamentoso de unos 10-15 nm de diámetro que están principalmente formados de agregados de α -sinucleína con conformaciones anormales. En condiciones normales, el α -sinucleína se encuentra en las terminales presinápticas, pero en condiciones patológicas se encuentra formando inclusiones citoplasmáticas (Gil, 2009).

Además del α -sinucleína, los CL se componen químicamente de ubiquitina y proteínas de los neurofilamentos como proteínas cinasas, microtúbulos de alto peso molecular asociados a tubulina, la ubiquitin-carboxil-terminal hidrolasa PGP-9 (Gil, 2009) y

precursores de amiloide. Los CL corticales contienen también tropomiosina y α -cristalina (Buracchio *et al.*, 2005).

Los CL tienen una forma esférica con un núcleo bien diferenciado rodeado de un halo periférico. Usando técnicas de microscopía electrónica, se puede observar que el centro contiene material granular debido a la ubiquitina acumulada y el halo periférico se compone de filamentos de α -sinucleína (Gil, 2009; Figura 1).

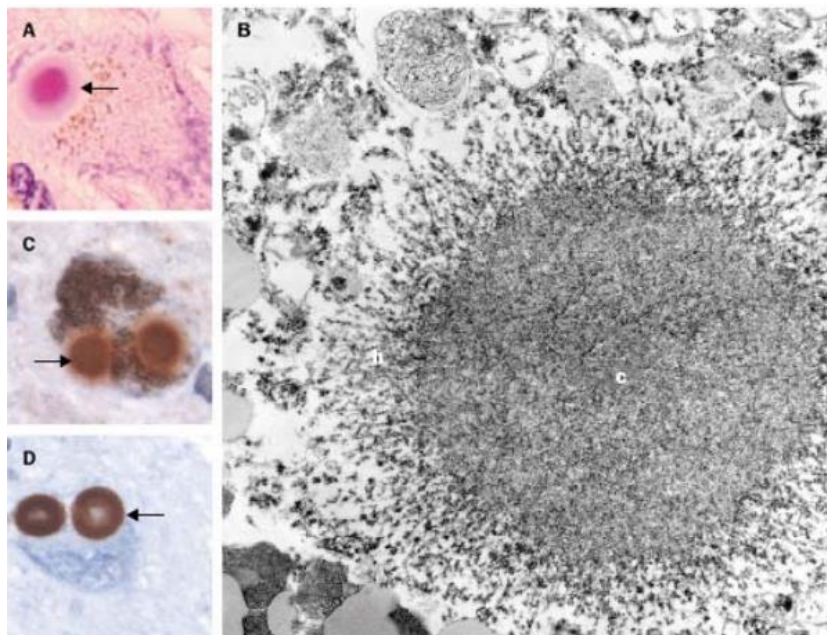


Figura 1. Microfotografías de CL visualizados con distintas técnicas: (A) tinción histológica para hematoxilina y eosina. (B) microscopía electrónica de transmisión. (C, D) inmunohistoquímica para α -sinucleína, ubiquitina.

Braak H. y colaboradores (2003) han propuesto un sistema de estadificación de las alteraciones patológicas en la EP que se desarrolla en 6 diferentes etapas. El sistema de estadificación se deriva de estudios de autopsias en pacientes sanos y pacientes con EP. Es decir, que se basa en el desarrollo de estas inclusiones en diferentes regiones del cerebro (Braak *et al.*, 2003). Durante la primera y segunda etapas se afectan la

médula oblonga, el núcleo motor dorsal del nervio vago, el bulbo olfatorio, el núcleo olfatorio anterior y el *locus coeruleus* (Braak *et al.*, 2003).

En las etapas 3 y 4 se ven involucradas la sustancia negra, en donde se encuentran las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal y la porción basal del cerebro medio y el prosencéfalo. Braak *et al.* (2003) propusieron que entre estas dos etapas está el umbral entre las alteraciones cognitivas y las manifestaciones motoras (Braak *et al.*, 2003).

Durante las etapas 5 y 6 el proceso degenerativo se extiende hacia la neocorteza, los cambios patológicos antes mencionados aumentan y los cuerpos de inclusión se hacen presentes en la corteza prefrontal (Braak *et al.*, 2003; Figura 2).

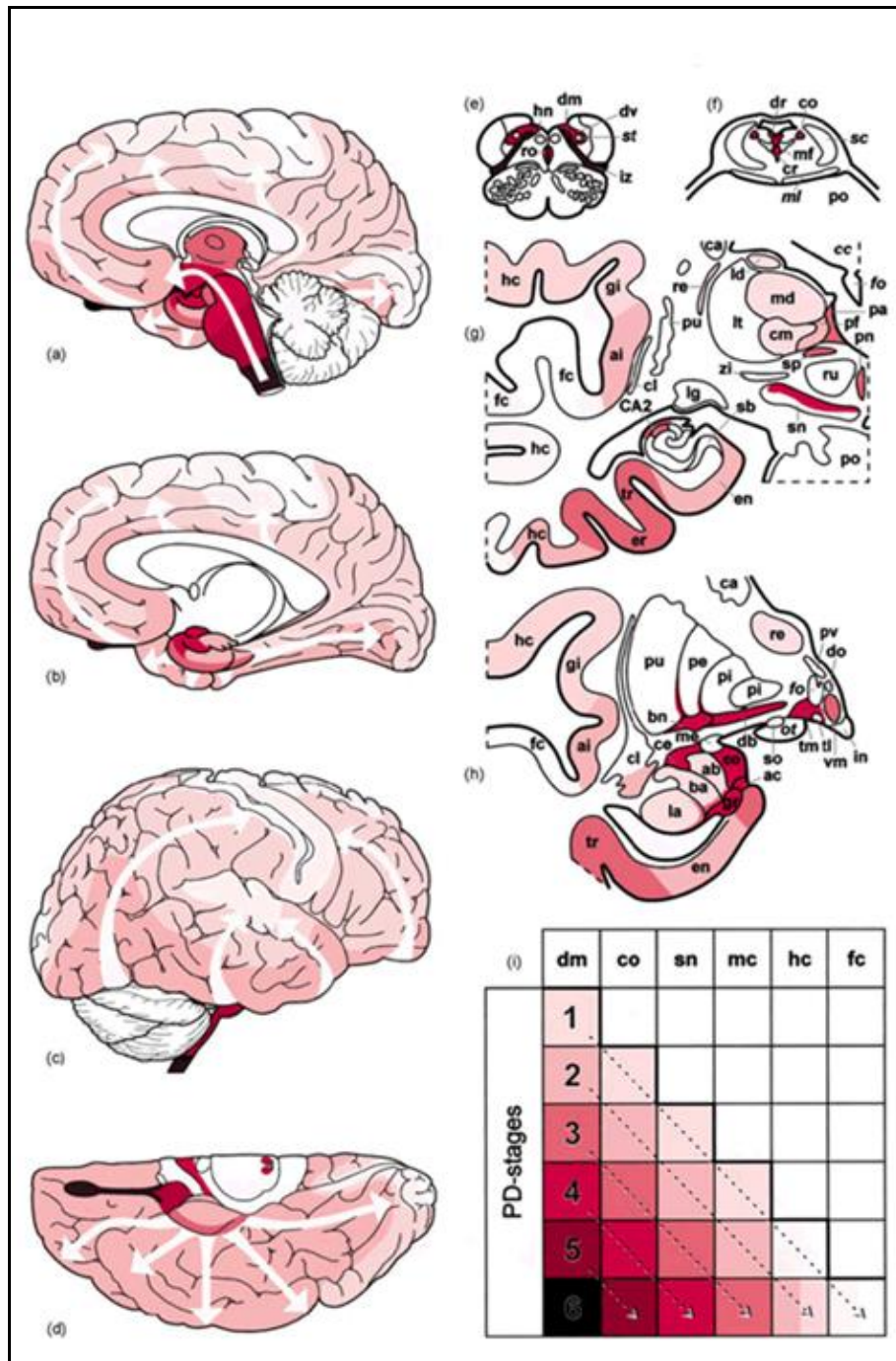


Figura 2. Esquema que representa los estadios patológicos en la EP, según Braak y cols. (2003). Los diferentes tonos de rojo representan la distribución y la severidad de las lesiones patológicas (cuerpos de Lewy) a lo largo de la progresión de la enfermedad. dm (Núcleo dorsal motor); co (complejo coeruleus–subcoeruleus); sn (sustancia negra); mc (temporal arteromedial); hc (áreas de asociación sensorial y campos prefrontales); fc (áreas de asociación sensorial).

3.2. Etiología y factores de riesgo.

3.2.1. Factores de riesgo.

El origen étnico de las personas es uno de los factores de riesgos asociados con la enfermedad (Tanner, 2008). Los estudios epidemiológicos indican que personas de piel blanca tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad que las personas de color (Kessler, 1972). Otro factor de riesgo es el género, se ha visto una mayor incidencia de la enfermedad en personas del sexo masculino que en las de sexo femenino (Rajput *et al.*, 2008) y un comienzo de la enfermedad más temprano en hombres que en mujeres, sin embargo, el promedio de la edad a la que mueren es muy similar en ambos sexos, por lo que la expectativa de vida no aumenta en las mujeres (Diamond *et al.*, 1990).

Algunos estudios han sugerido que consumir cafeína, así como fumar se asocian a una disminución en el riesgo de padecer la enfermedad. Las personas que fuman con frecuencia tienen un riesgo menor en comparación con las que fuman en cantidades menores, dicho efecto ha sido atribuido a la acción de la nicotina sobre los receptores colinérgicos, sin embargo, hasta el momento la evidencia solo es epidemiológica. En hombres, el alto consumo de cafeína también reduce el riesgo de desarrollar EP, no siendo así entre las mujeres en las cuales, el bajo riesgo está asociado al consumo bajo o moderado de cafeína (Ascherio *et al.*, 2001).

3.2.2. Etiología.

La EP es el prototipo de enfermedad en la cual se propone que existe una importante interacción entre la genética y los factores ambientales. Se ha demostrado que las manifestaciones del Parkinson pueden ser causadas tanto por la exposición a agentes tóxicos (manganeso, organofosforados, etc.) como por mutaciones en genes específicos (Tanner, 2008). Los factores genéticos pueden desempeñar un papel

importante en el desarrollo de la EP, pueden ser hereditarios y pueden existir factores ligados al sexo que modulen la edad de inicio de la enfermedad (Hilmas *et al.*, 2001). Sin embargo, se estima que sólo entre el 5-10% de los casos presentan un patrón hereditario que puede ser autosómico dominante o recesivo (Hardy *et al.*, 2009).

En las formas hereditarias se han encontrado, al menos 5 mutaciones asociadas con la enfermedad: α -sinucleína (o PARK1), parkina (PARK2), DJ-1 (PARK7), cinasa putativa 1 inducida por PTEN (PARK6) y la cinasa 2 rica en leucina (PARK8; Tanner, 2008).

La duplicación o triplicación anormal de PARK1 genera la sobreexpresión del α -sinucleína, lo que conduce a su acumulación y ocasiona demencia por la formación de CL (Tanner, 2008).

La PARK 2 funciona como una ligasa E3 de ubiquitina que cataliza la adición de ubiquitina a las proteínas y las marca para su degradación. Cuando disminuye la actividad de esta ligasa, se modifica la vía de degradación de ubiquitina por proteosomas y produce su acumulación, lo cual tiene efectos tóxicos que contribuyen a la muerte de células dopaminérgicas. También juega un papel en el estrés oxidativo y en la función mitocondrial (Kitada *et al.*, 1998).

La PARK6 protege a las células de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, porque las protege de la apoptosis en situaciones de estrés, por lo que una mutación en este gen, modifica esta actividad favoreciendo la muerte neuronal (Tanner, 2008).

La DJ-1 es una proteína codificada por PARK7, que tiene entre sus funciones, proteger las células del estrés oxidativo. Actúa como chaperona en el plegamiento de proteínas *de novo*, en el repliegue de proteínas que han sufrido daño y en el transporte de ciertas moléculas hacia los proteosomas (Abou-Sleiman *et al.*, 2003). Las mutaciones en PARK7 se asocian con una menor protección frente al estrés oxidativo así como con un

déficit en la actividad de DJ-1 lo que provoca la acumulación tóxica de proteínas mal plegadas o dañadas y finalmente a la muerte celular (Abou-Sleiman *et al.*, 2004).

Las mutaciones en PARK8 se asocian con el déficit de los proteosomas de ubiquitina, la degradación protéica, la disfunción mitocondrial, el aumento anormal en fosforilaciones y promueven el aumento de actividad en cinasas, lo cual está ligado a la toxicidad celular (Zimprich *et al.*, 2004).

Por otro lado, según un meta-análisis reciente, que incluyó estudios de asociación de genoma completo, hasta ahora se han descrito al menos 11 loci genéticos que se ha relacionado de forma significativa con el desarrollo de la EP de tipo esporádica: BST1, CCDC62/HIP1R, DGKQ/GAK, GBA, LRRK2, MAPT, MCCC1/LAMP3, PARK16, SNCA, STK39, SYT11/RAB25. Sin embargo, la significancia fisiopatológica de muchos de estos loci aún se desconoce (Lill *et al.*, 2012).

3.3. Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson.

La EP está relacionada con la degeneración neuronal progresiva que afecta principalmente a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en su parte compacta (SNc), lo cual produce la disminución en la producción de dopamina (DA), primordialmente en la vía nigro-estriatal, que forma una parte muy importante del circuito fronto-basal esqueleto-motor, que está involucrado en la regulación de los movimientos voluntarios (Blandini *et al.*, 2000).

Los ganglios basales son un grupo de núcleos formados por el caudado, el putamen, el globo pálido externo e interno (GPi y GPe) y sustancia negra que se encuentran en la profundidad de los hemisferios cerebrales y que se encargan, entre otras muchas funciones, de la regulación del movimiento voluntario (Blandini *et al.*, 2000). Las conexiones que tienen los ganglios basales con otras estructuras como el tálamo, el

núcleo pedúnculo-pontino y la corteza cerebral forman circuitos que se retroalimentan y regulan continuamente para la adecuada ejecución de los movimientos voluntarios (Jenner, 2003).

Por lo general se considera que este circuito motor fronto-basal, tiene dos vías principales: la vía directa y la vía indirecta. Ambas vías se inician en neuronas GABAérgicas espinosas medianas localizadas en el cuerpo estriado: la vía directa está formada por neuronas GABAérgicas con receptores dopaminérgicos tipo D1 que co-localizan para los neuropéptidos dinorfina y sustancia P; mientras que la vía indirecta está formada por neuronas GABAérgicas con receptores dopaminérgicos tipo D2 que co-localizan para encefalina (Jenner, 2003; Figura 3).

Se considera que en la fisiología normal, la vía directa facilita los movimientos, mientras que la vía indirecta los inhibe. Normalmente existe un balance adecuado en la actividad de estas dos vías que permite la facilitación de algunos movimientos y la inhibición de otros para la correcta ejecución motora. En este sentido las aferencias dopaminérgicas ejercen normalmente un efecto inhibitorio sobre la vía indirecta y un efecto estimulador sobre la vía directa resultando en una promoción de los movimientos voluntarios. En la EP la disminución de las aferencias dopaminérgicas hacia el cuerpo estriado produce el aumento en la actividad de la vía indirecta provocando hiperactividad del núcleo subtalámico (NST), que se refleja en la sobre-estimulación del GPi, el cual a su vez inhibe severamente el tálamo y por ende a la corteza cerebral, lo que resulta finalmente en la inhibición general del movimiento voluntario (Jenner, 2003).

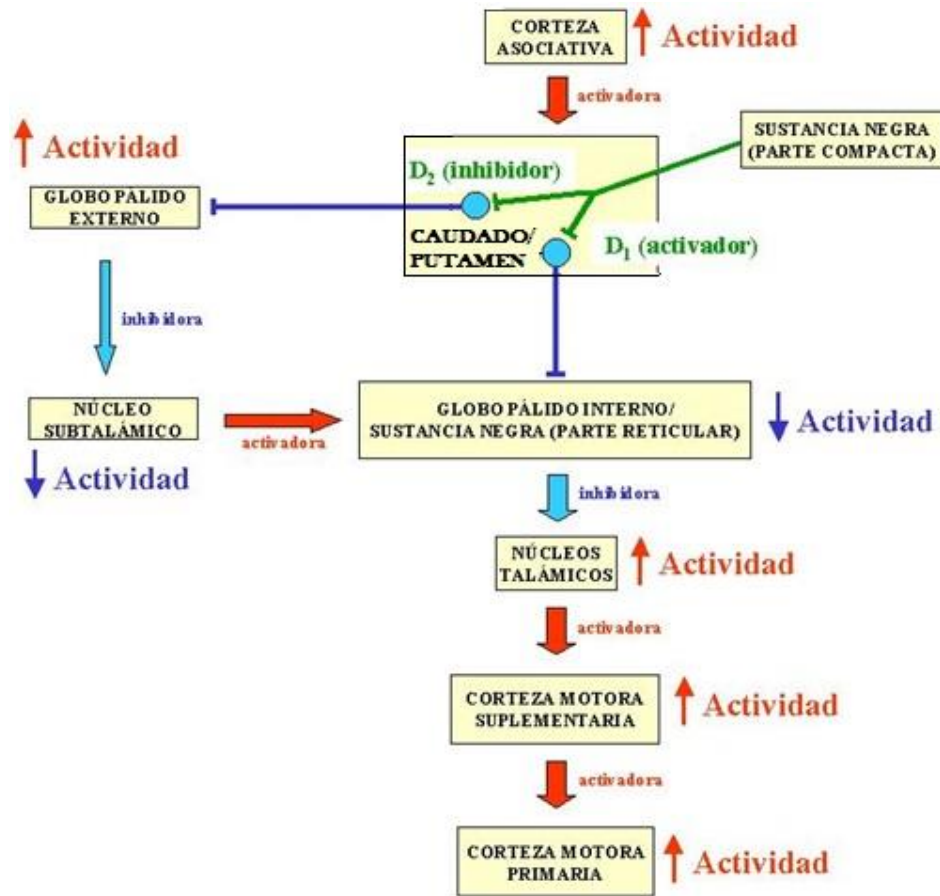


Figura 3. Diagrama esquemático que representa el circuito fronto-basal motor normal, con los núcleos de los ganglios basales involucrados.

3.4. Tratamiento farmacológico de la Enfermedad de Parkinson.

El tratamiento farmacológico de la EP se centra principalmente en el fomento de la neurotransmisión dopaminérgica a través de distintas clases de fármacos. El principal fármaco continúa siendo la levodopa (L-3,4 dihidroxi fenilalanina; L-DOPA) que es un precursor de la DA (Figura 4), que requiere de la co-administración de algún inhibidor de la DOPA-descarboxilasa periférica (benzerazida o carbidopa) para garantizar su efecto en el sistema nervioso central (SNC), además de que depende de una transformación enzimática previa para la formación de DA (Olanow *et al.*, 2009).

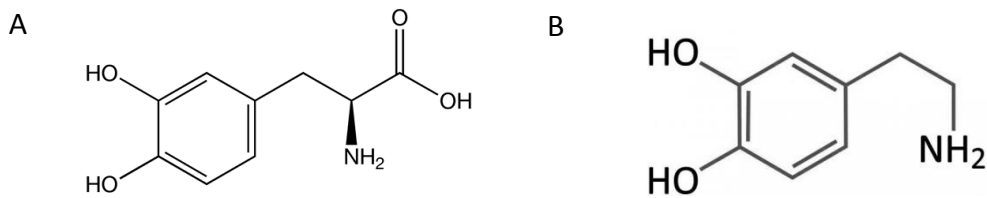


Figura 4. Estructura química de la levodopa (A) y de la dopamina (B).

Por otro lado, están los fármacos agonistas dopaminérgicos, que son fármacos que se unen y activan a distintas subpoblaciones de receptores dopaminérgicos. Entre las ventajas de estos fármacos están que para su acción no se requiere de conversiones enzimáticas y no dependen de transportadores para su absorción por el tracto gastrointestinal ni para el paso a través de la barrera hemato-encefálica (BHE), por ejemplo, bromocriptina, lisuride, pergolida, cabergolina, ropinirole, pramipexole, etc. (Jenner, 2003; Korczyn, 2003).

Además se utilizan los inhibidores de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B), enzima que cataliza la desaminación oxidativa de catecolaminas como la DA. La inhibición de éstas impide la desaminación de la DA permitiendo el aumento intracerebral de ésta. La rasagilina y la selegilina son ejemplos de fármacos con esta actividad (Waters, 2008).

Otro tipo de fármacos son los inhibidores de la catecol O-metiltransferasa (COMT), esta enzima normalmente convierte a la DA en el metabolito inerte 3-O-metildopa, por lo que la inhibición farmacológica de esta enzima incrementa la vida media de la DA de 90min hasta aproximadamente 3 horas. Ejemplos de este tipo de fármacos son el Tolcapone y Entacapone (Olanow *et al.*, 2009).

Sin embargo, hasta el momento no existe ningún tratamiento que modifique significativamente el curso natural de la enfermedad. El tratamiento sintomático de elección continúa siendo la administración exógena de precursores de DA como la L-DOPA por vía oral (Olanow *et al.*, 2009). La L-DOPA produce mejoría sintomática en

más del 90% de los casos de EP; sin embargo, el uso prolongado, precoz y a dosis altas se ha relacionado con el desarrollo de complicaciones clínicas, como las fluctuaciones motoras y las DSC (Ahlskog *et al.*, 2001).

3.5. Complicaciones del tratamiento con levodopa.

Se calcula que entre el 40-80% de los pacientes que consumen L-DOPA por un período de entre 5-10 años desarrollarán eventualmente alguna complicación motora (Buck *et al.*, 2010; Ahlskog *et al.*, 2001), lo cual se relaciona con la reducción de su eficacia y utilidad clínica (Fabbrini *et al.*, 2007). Las complicaciones crónicas de la terapia con L-DOPA suelen ser fundamentalmente motoras, específicamente: fluctuaciones motoras y DSC, sin embargo, otras complicaciones neuropsiquiátricas como la psicosis también pueden presentarse (Sage, 2008).

Las fluctuaciones motoras se refieren a cambios que ocurren en el inicio, la duración o la eficacia del efecto farmacológico antiparkinsoniano presentado por la L-DOPA. Las fluctuaciones motoras se pueden manifestar en distintos periodos clínicos por ejemplo: el deterioro de fin de dosis, en el cual el paciente sufre un deterioro clínico relacionado con el final del efecto del fármaco; el retraso del efecto “on” en el cual el paciente refiere que después de la toma del medicamento existe un atraso en el inicio de los efectos positivos; la reducción de la duración del efecto “on” en el cual el paciente refiere que la duración de los efectos positivos de la L-DOPA ha disminuido, etc. (Buck *et al.*, 2010). Cuando alguna de estas complicaciones sucede, la dosis, la frecuencia de administración e incluso la presentación farmacéutica o la vía de administración de la L-DOPA deben ser modificadas para continuar obteniendo beneficios clínicos (Hinson, 2010).

Las DSC por otra parte, no constituyen sólo cambios en los efectos positivos de la L-DOPA, sino la aparición de movimientos involuntarios erráticos y sin propósito que pueden presentarse en distintas regiones corporales con distintas severidades, y que de

la misma forma que las fluctuaciones, pueden presentarse en distintos momentos de la administración de la L-DOPA (Nutt, 2005). Típicamente se distinguen dos tipos DSC: de fin de dosis o en “off” y DSC de pico de dosis o en “on”, aunque también están descritas las DSC bifásicas que se presentan tanto en períodos “on” como en “off”.

Las DSC en “on” (de “pico de dosis”) se han relacionado con la elevación máxima de la concentración plasmática de la L-DOPA, lo cual clínicamente se manifiesta con: movimientos estereotipados faciales o bucolinguales, movimientos coreiformes, distonía de las extremidades o posturas corporales anormales (Hinson, 2010). Este tipo de DSC se considera la más típica, y aunque el término “pico de dosis” pareciera sugerir que sólo se presentan en el momento del pico plasmático más elevado, en realidad en la práctica los pacientes suelen cursar con las DSC en toda la duración del período “on”, es decir, ocurre paradójicamente en el momento en el que cursa con los beneficios clínicos de la L-DOPA sobre la rigidez y bradicinesia. De tal forma que la aparición de estas DSC merma de forma importante el beneficio objetivo que el paciente obtiene del fármaco (Fabbrini *et al.*, 2007).

3.6. Fisiopatología de las DSC inducidas por levodopa.

Es claro que existen diversos factores que afectan el desarrollo de las DSC, por un lado la frecuencia y severidad de éstas es mayor con el uso de L-DOPA que con otros agonistas dopaminérgicos, lo cual sugiere que el mecanismo de acción de los fármacos puede influir en el desarrollo de la complicación. Por otro lado, la severidad de la pérdida neuronal dopaminérgica juega un papel muy importante en el desarrollo de las DSC, ya que, tanto en humanos como en modelos experimentales el uso crónico de L-DOPA no produce DSC en sujetos sanos o sin pérdida neuronal dopaminérgica, y a su vez la severidad de las DSC se correlaciona bien con la progresión de la pérdida neuronal en la SNc. Otro factor que también se ha relacionado de forma consistente con el desarrollo

de las DSC es la frecuencia y severidad de éstas, donde es más elevada cuando inicia antes de los 40 años que cuando inicia después de esta edad, lo cual también parece relacionarse con la mayor severidad y velocidad de progresión que se observa en las formas juveniles de la enfermedad (Calabresi *et al.*, 2010).

La teoría clásica del desarrollo de las DSC secundarias al tratamiento dopaminérgico propone que los cambios que ocurren en las vías directa e indirecta en la EP, suceden pero en sentido inverso, es decir, que los receptores D1 y D2 son sobre-estimados por la L-DOPA, lo cual inhibe la vía indirecta y sobre-estimula la vía directa y en consecuencia se producen los movimientos anormales (Figura 5), sin embargo, esta hipoactividad de la vía indirecta no se ha comprobado del todo en los estudios experimentales, por lo que, en la actualidad esta teoría se considera excesivamente simplista para explicar el desarrollo de las DSC (Jenner, 2003).

Otros mecanismos que se han sugerido para explicar el desarrollo de las DSC son: 1) La distribución irregular de la DA en el estriado como producto de la enfermedad o de su tratamiento con L-DOPA; 2) La denervación crónica generada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas, aunada a la estimulación pulsátil que genera la administración de L-DOPA (dicha hipótesis está apoyada por el hecho de que los agonistas dopaminérgicos de acción prolongada o las formulaciones de L-DOPA de liberación sostenida se asocian a una menor incidencia de DSC; 3) Como producto de la denervación crónica dopaminérgica se ha demostrado un cambio en la señalización intracelular de las proteínas ERK1/2 -MAPK en las neuronas de la vía directa (que facilita el movimiento), lo cual se ha relacionado con la hipersensibilidad de los receptores D1; y 4) Otros cambios que se han demostrado como producto de la denervación crónica dopaminérgica son cambios en las subpoblaciones, distribución y funcionamiento de los rNMDA estriatales (Gottwald, 2011).

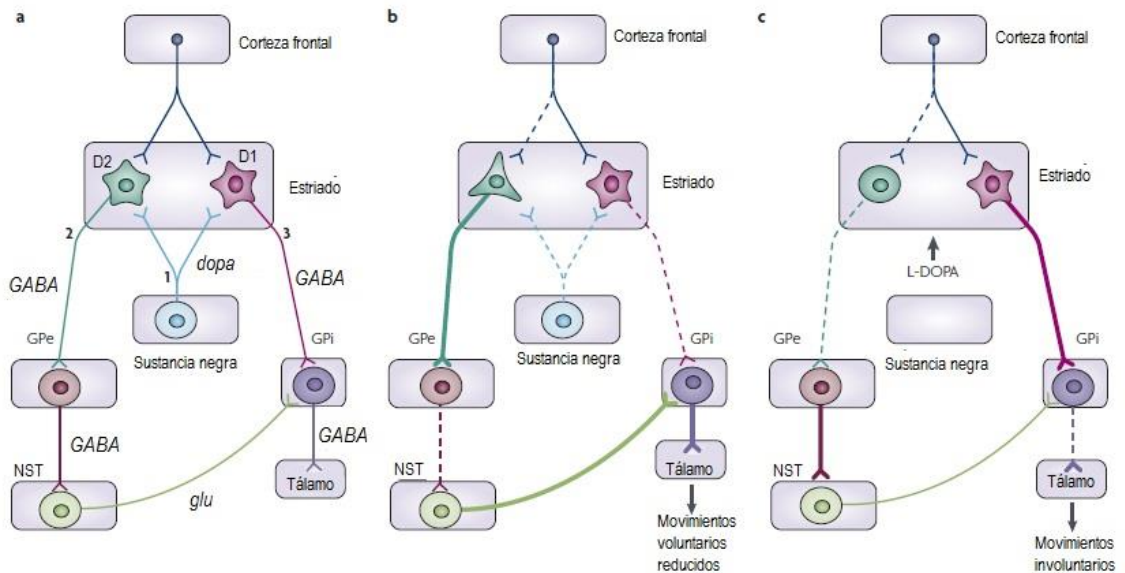


Figura 5. Vía de los ganglios basales en condiciones normales (a), en EP (b) y con administración de L-Dopa (c).

3.7. Glutamato y discinesias inducidas por levodopa.

El papel de la neurotransmisión glutamatergica en las DSC está bien demostrado por diversos estudios experimentales en donde se comprobó la existencia de alteraciones en las subpoblaciones de los receptores glutamatergicos así como en su funcionalidad y plasticidad (Carrillo-Mora *et al.*, 2013; Buck *et al.*, 2010). Además existe evidencia que apoya que la inhibición de la actividad glutamatergica del NST, mediante estimulación cerebral profunda disminuye la frecuencia y severidad de las DSC e incluso mejora el rendimiento motor (Gubellini *et al.*, 2006). Así mismo, diversos estudios clínicos y experimentales han descrito mejoría de las DSC con el uso de diversos fármacos antiglutamatergicos (Carrillo-Mora *et al.*, 2013), desde distintos antagonistas NMDA selectivos y no selectivos, antagonistas AMPA e incluso antagonistas de receptores metabotrópicos (Cooper *et al.*, 1998; Buck *et al.*, 2010). Toda esta evidencia respalda el hecho de que por el momento el único tratamiento aceptado por la FDA para el manejo de las DSC en el enfermo con EP, es la AMA que es un antagonista no competitivo de los rNMDA (Buck *et al.*, 2010; Carrillo-Mora *et al.*, 2013; Olanow, 2009). En la actualidad,

se han empleado distintos antagonistas glutamatérgicos en el manejo de las DSC y fluctuaciones motoras, tanto a nivel experimental como clínico; sin embargo, aunque se ha demostrado que múltiples fármacos tienen efectos positivos sobre los movimientos anormales, la mayor parte de ellos presenta también diversos efectos colaterales (ataxia, sedación, psicosis, etc.) que disminuyen los efectos positivos presentados por la L-DOPA (Buck *et al.*, 2010; Carrillo-Mora *et al.*, 2013; Gottwald *et al.*, 2011). Por lo tanto, resulta muy importante el desarrollo de alternativas terapéuticas que sean capaces de reducir, e incluso prevenir el desarrollo de las DSC inducidas por L-DOPA (DIL), sin afectar los efectos positivos de este fármaco sobre la motricidad.

3.8. Tratamiento de las discinesias inducidas por la administración crónica de levodopa.

El manejo inicial de las DSC inducidas por L-DOPA, al igual que ocurre con las fluctuaciones motoras debe comenzar con ajustes de la dosis: disminución, fraccionamiento, formulaciones o vías de administración, así como el uso de otros fármacos de forma adyuvante (agonistas dopaminérgicos, inhibidores de MAO-B, inhibidores de la COMT, etc.). A pesar de esto, en muchos de los casos será necesaria la adición de un tratamiento farmacológico dirigido al control de los movimientos anormales. En la actualidad, para el manejo de estas complicaciones motoras se han propuesto gran diversidad de fármacos con distintos mecanismos de acción como: agonistas serotoninérgicos, antagonistas de receptores de adenosina, antagonistas noradrenérgicos, cannabinoides, antagonistas glutamatérgicos, etc. (Buck *et al.*, 2010). Esta última categoría de fármacos es la única que está actualmente aceptada para su uso clínico. Por ello, debido a su eficacia, la AMA continúa siendo el tratamiento de elección para el manejo de las complicaciones motoras secundarias al uso de L-DOPA (Olanow *et al.*, 2009; Buck *et al.*, 2010). Sin embargo, con el uso de AMA se han descrito efectos variables de paciente a paciente, aún es controversial el efecto benéfico de la misma a largo plazo y se ha observado que su uso crónico puede asociarse al

desarrollo de diversos efectos colaterales como pérdida de peso, constipación, inestabilidad, visión borrosa, retención urinaria, *lívedo reticularis*, insomnio, mareos, nerviosismo, sequedad de boca, cansancio y malestar abdominal (Crosby *et al.*, 2008). Otra alternativa para el tratamiento de las DSC son las intervenciones quirúrgicas en las que se estimula el NST y el GPi provocando la disminución del temblor, la bradicinesia y la rigidez, así como el retraso del período de fin de dosis y por lo tanto, la posibilidad de reducir las dosis de administración de L-DOPA. Sin embargo, la neurocirugía, además de ser de alto costo, se asocia a riesgos durante el procedimiento y requiere de un seguimiento de ajuste del estímulo para mantener buenos resultados (Buck *et al.*, 2010).

Es por esto que la búsqueda de un fármaco que permita controlar las DSC, sin disminuir los efectos positivos de la L-DOPA y que cuente con un bajo perfil de efectos colaterales continúa hasta la fecha.

3.9. Vía de la kinurenina y el ácido kinurénico.

La vía de la kinurenina (VK), descrita desde 1947, es una vía catabólica del triptófano ampliamente conservada en el reino animal y que es responsable, de la síntesis de nicotinamida adenín dinucleótido (NAD⁺), coenzima de vital importancia para las reacciones de óxido-reducción en todas las células eucariontes (Perez-De La Cruz *et al.*, 2007). Esta vía metabólica resulta muy importante para la fisiología y fisiopatología del sistema nervioso por el hecho de que produce, al menos dos metabolitos neuroactivos con efectos completamente opuestos (ácido quinolínico, QUIN y el ácido kinurénico, KYNA), los cuales derivan directa o indirectamente de la L-kinurenina (L-KYN), que es el producto primario más importante de la degradación del triptófano (Lapin, 1978A; Lapin, 1978B; Schwarcz *et al.*, 2002). En mamíferos, la VK es la principal vía catabólica del triptófano no proteico y se estima que más del 80% del triptófano ingerido en la dieta es metabolizado por esta vía (Perez-De La Cruz *et al.*, 2007; Figura 6).

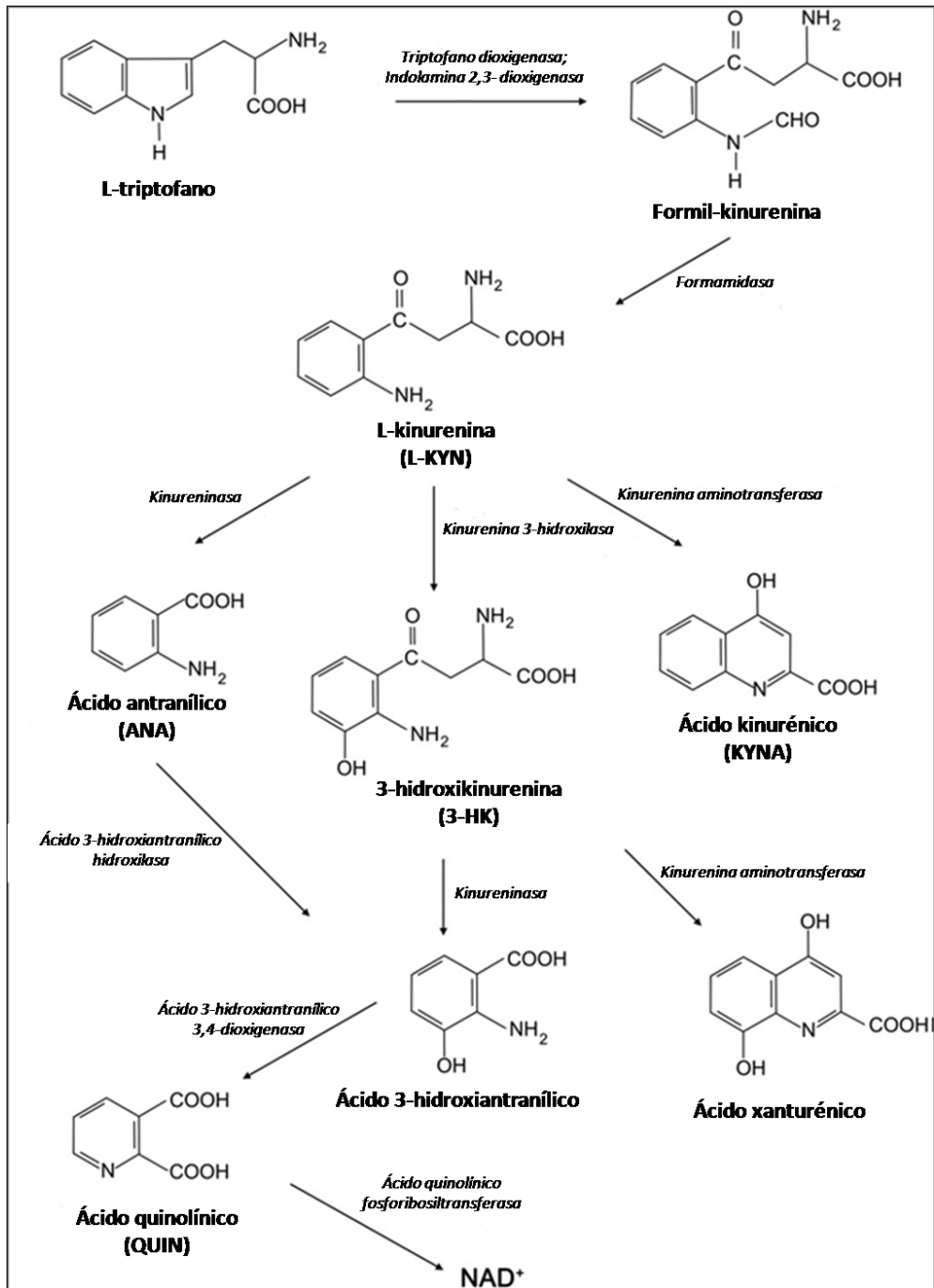


Figura 6. Vía de degradación de L-triptófano a través de la VK. El KYNA es sintetizado a través de una transaminación irreversible del precursor L-KYN.

El KYNA es una de las kinureninas de la que más recientemente se comprobó su presencia en el tejido nervioso (Carlá *et al.*, 1988; Figura 7). Se estima que el contenido total de KYNA en cerebro de rata es de aproximadamente 24 pmol/g aunque existen

variaciones regionales de concentración dentro del SNC: las concentraciones menores están en el cerebelo (15 pmol/g) y las más altas en el tallo cerebral (29 pmol/g; Moroni *et al.*, 1988). El hipocampo parece tener la concentración basal más alta de KYNA de entre las diversas regiones corticales (Turski *et al.*, 1988; Swartz *et al.*, 1990). Un estudio llevado a cabo por Turski y cols. (1988), en el tejido nervioso de humano obtenido de autopsias de pacientes entre 50-71 años, se demostró que las concentraciones más elevadas de KYNA se encontraron en el núcleo caudado (1.58 pmol/mg) mientras que las más bajas se observaron en el cerebelo (0.14 pmol/mg; Turski *et al.*, 1988).

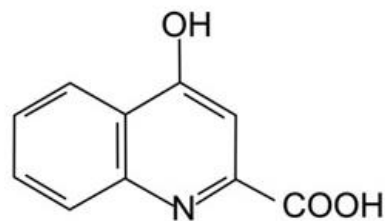


Figura 7. Estructura química de KYNA.

El KYNA es el único inhibidor conocido de receptores de aminoácidos excitadores de origen endógeno, y se le ha demostrado un amplio espectro de acción. En concentraciones muy elevadas, el KYNA tiene propiedades anticonvulsivas y neuroprotectoras (Foster *et al.*, 1984; Lekieffre *et al.*, 1990). En concentraciones de 8-20 μM , el KYNA actúa como un bloqueador competitivo del sitio co-agonista de glicina en el rNMDA, y en concentraciones superiores a 50-500 μM puede incluso bloquear el sitio agonista del glutamato (Kessler *et al.*, 1989; Stone, 1993). En concentraciones en rangos nanomolares a micromolares ($\sim 7 \mu\text{M}$), funciona además como un inhibidor no competitivo del receptor α -7 nicotínico de acetilcolina (Hilmas *et al.*, 2001; Schwarcz, *et al.*, 2002). El hecho de que las concentraciones necesarias de KYNA para su acción en receptores sean muy cercanas a las fisiológicas (15-150 pmol/g), sugiere un papel importante en la neurotransmisión colinérgica y glutamatérgica normal (Hilmas *et al.*, 2001). El KYNA, por su naturaleza polar, atraviesa pobremente la barrera

hematoencefálica, por lo que la mayor parte de KYNA disponible en el SNC es sintetizado a partir de precursores por parte de astrocitos y células microgliales locales (Vamos *et al.*, 2009). Esta característica química limita su posible administración sistémica con fines terapéuticos, y es por ello que se han desarrollado distintos análogos modificados del KYNA que pueden atravesar la BHE con mayor facilidad, aunque a veces la potencia de estos compuestos sea menor que la de la molécula original (Stone, 1993; Marosi *et al.*, 2010). Además de sus reconocidas propiedades como antagonista de distintos receptores, existe evidencia experimental *in vitro* que demuestra efectos antioxidantes directos del KYNA, ya que se ha demostrado que posee capacidad significativa de atrapar tanto radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) como superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$; Goda *et al.*, 1999; Lugo-Huitron *et al.*, 2011; Zsizsik *et al.*, 2002).

3.10. Manipulación farmacológica de la vía de la kinurenina.

Desde la descripción inicial de las propiedades antagónicas del KYNA sobre distintos receptores de neurotransmisores, en especial sobre los rNMDA, se han realizado múltiples manipulaciones farmacológicas con la finalidad de incrementar los niveles endógenos del KYNA como una estrategia de neuroprotección (Wu *et al.*, 2006; Stone, 2000). Se ha demostrado que la utilización de precursores (triptófano, L-KYN), inhibidores enzimáticos de la kinurenina hidroxilasa y/o kinureninasa (NICALA, meta-nitrobenzoalalina), e inhibidores de la excreción cerebral de KYNA (probenecid), constituyen estrategias neuroprotectoras eficaces y se han utilizado con éxito a nivel experimental desde hace casi 20 años (Moroni *et al.*, 1991; Vécsei *et al.*, 1992^a; Vécsei *et al.*, 1992^B; Carpenedo *et al.*, 1994; Pellicciari *et al.*, 1994; Silva-Adaya *et al.*, 2011; Carrillo-Mora *et al.*, 2010).

3.11. Probenecid.

El ácido 4-[(dipropilamino) sulfonil] benzoico, conocido como probenecid (PROB), (Figura 8) es un agente uricosúrico que se utiliza en el tratamiento de la gota desde hace muchos años. Se trata de un inhibidor del transporte de ácidos orgánicos y es un modulador de la actividad de las proteínas con resistencia a múltiples drogas (MRPs) en distintas barreras epiteliales; proteínas que actúan como transportador primario de algunos compuestos orgánicos endógenos como el KYNA (Miranda *et al.*, 1997). Así mismo, el PROB aumenta las concentraciones en suero de diversos fármacos (antibióticos, antiepilépticos, quimioterápicos, etc.) lo cual prolonga su acción terapéutica (Campos-Arroyo *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que la administración de PROB inhibe la excreción del KYNA del tejido nervioso y como resultado provoca aumento en su concentración en relación con la dosis sistémica administrada (Miller *et al.*, 1992).

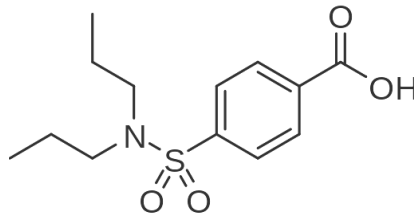


Figura 8. Estructura química del probenecid.

3.12. Kinureninas y enfermedad de Parkinson.

En varios estudios, usando tejido cerebral post-mortem de pacientes con EP se ha demostrado alteración de distintos metabolitos de la VK (Szabó *et al.*, 2011). El hallazgo más consistente ha sido la disminución del precursor L-KYN y del KYNA, tanto a nivel de la corteza frontal, como en el putamen y la sustancia negra (Ogawa, 1992).

Así mismo se he encontrado que los niveles de KYNA son significativamente menores en el cerebro de pacientes que han sido tratados con L-DOPA en comparación con los que no han recibido este tratamiento. En estudios experimentales previos se demostró que la inyección local de KYNA en el GPi indujo conducta de rotación contralateral en los animales de experimentación pero al mismo tiempo mejoró los síntomas parkinsónicos en modelos de EP, tanto en roedores como en primates no humanos (Robertson *et al.*, 1989; Graham *et al.*, 1990; Brotchie *et al.*, 1991). Recientemente se demostró que la inhibición farmacológica prolongada de la kinurenina 3-hidroxilasa (enzima responsable de la biosíntesis de 3-hidroxi-kinurenina y el QUIN, y cuya inhibición deriva el metabolismo del triptófano hacia la síntesis del KYNA) disminuye la aparición de DIL en monos parkinsónicos sin afectar los efectos positivos obtenidos con la L-DOPA (Grégoire *et al.*, 2008).

3.13. Modelo de parkinsonismo inducido por la toxina 6-hidroxidopamina.

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es un análogo hidroxilado de la DA utilizado en modelos de degeneración de las proyecciones catecolaminérgicas (Schober, 2004). Es ampliamente aplicada en el desarrollo de modelos experimentales de EP en roedores (Blum *et al.*, 2001; Ungerstedt, 1968).

La toxicidad inducida por la 6-OHDA es relativamente selectiva de neuronas catecolaminérgicas, lo que resulta en una receptación preferencial de los transportadores dopaminérgicos y noradrenérgicos (Luthman *et al.*, 1989). Dentro de las neuronas, la toxina se acumula en el citosol e induce muerte celular (Jeon *et al.*, 1995).

Se ha reportado que la degeneración inducida por ésta toxina, involucra el procesamiento de peroxidasas y radicales hidroxilo. Además de que reduce los niveles estriatales de glutatión, la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y aumenta los niveles del malondialdehído (Schober, 2004).

La 6-OHDA administrada sistémicamente no atraviesa la BHE, es necesaria su administración intracerebral para producir una depleción de los niveles dopaminérgicos por neurodegeneración (Perese *et al.*, 1989). Los sitios preferentes de administración son la sustancia negra, el estriado y el haz prosencefálico medial (HPM; Faull & Laverty, 1969). La magnitud de la lesión depende de la cantidad de toxina administrada y del sitio de administración (Betarbet *et al.*, 2002).

La lesión bilateral puede inducir síntomas motores parkinsonianos, sin embargo, ésta afecta severamente a los animales y se requiere de cuidados intensivos post cirugía. La lesión unilateral es conocida como “modelo de hemiparkinsonismo”, los animales son viables y la lesión produce asimetría y conducta motora inducida, cuantificables. (Cenci *et al.* 2002; Hefti *et al.* 1980 B).

Después de la lesión, un tratamiento con agonistas dopaminérgicos como la apomorfina, fármacos liberadores de dopamina como las anfetaminas o L-DOPA, induce una respuesta de giro contralateral a la lesión como resultado de la disfunción de las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en el hemisferio lesionado y ocasionan un desequilibrio con la liberación de dopamina del hemisferio que quedó intacto. (Schwartzing & Huston, 1996). El tiempo necesario para que se presente la conducta de giro depende de la dosis y región en donde se administre la toxina.

Si bien la administración intracerebral de la 6-OHDA no reproduce todas las condiciones patológicas de un paciente con EP como la formación de cuerpos de Lewy, sí reproduce el temblor, bradicinesia, rigidez muscular y alteración de los reflejos posturales que presenta un enfermo de Parkinson y es una aproximación que puede ser usada para probar fármacos o terapias (Schober, 2004).

4. Justificación.

La EP es una de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes y se estima que su incidencia irá en aumento en los siguientes años. El tratamiento sintomático más eficaz para el manejo de la EP continúa siendo la L-DOPA. Sin embargo, el uso crónico de la L-DOPA se asocia a distintas complicaciones, entre las cuales se encuentran las DSC, las cuales disminuyen la utilidad clínica de la misma. En el manejo de las DSC se han probado distintos fármacos, no obstante, los que han demostrado mayor eficacia son los antagonistas del rNMDA, sin embargo, los efectos colaterales limitan su utilidad terapéutica. Por ello es importante el desarrollo de alternativas terapéuticas para el manejo de estas complicaciones que ofrezcan no solo la posibilidad de disminuirlas, sino además de prevenirlas o evitarlas.

5. Hipótesis.

Considerando que el PROB aumenta los niveles cerebrales de KYNA, y que éste actúa como un antagonista de los rNMDA, esperamos que la administración i.p. de PROB disminuya significativamente el parkinsonismo y la severidad de las DSC inducidas por la administración crónica de L-DOPA.

6. Objetivo general.

Evaluar conductualmente el efecto antidiscinético y antiparkinsonico de PROB y buscar una relación con los niveles estriatales totales de KYNA.

7. Objetivos particulares.

- Evaluar conductualmente los efectos antiparkinsonicos de la administración de L-DOPA, AMA y PROB.

- Evaluar conductualmente los efectos antidiscinéticos de la administración de AMA y PROB.
- Comparar los efectos conductuales (antiparkinsonianos y antidiscinéticos) mostrados por los distintos fármacos.
- Determinar niveles estriatales totales de KYNA y buscar si se asocian con los resultados conductuales.

8. Métodos.

Para el estudio se formaron 6 grupos experimentales con 5-8 individuos cada uno. Utilizando ratas Wistar macho de entre 260-280 g. Los grupos se organizaron de la siguiente manera (Figura 9):

- a) Grupo control de PROB: sin lesión, con una dosis de PROB.
- b) Grupo sham: lesión con solución salina.
- c) Grupo control: lesión con 6-OHDA, sin administración de fármacos.
- d) Grupo con L-DOPA: lesión con 6-OHDA seguida 15-21 días de tratamiento con L-DOPA.
- e) Grupo con L-DOPA + PROB: lesión con 6-OHDA seguida de una dosis de PROB, 15-21 días de tratamiento con L-DOPA y una dosis final de PROB.
- f) Grupo con L-DOPA + AMA: lesión con 6-OHDA seguida de una dosis de AMA, 15-21 días de tratamiento con L-DOPA y una dosis final de AMA.

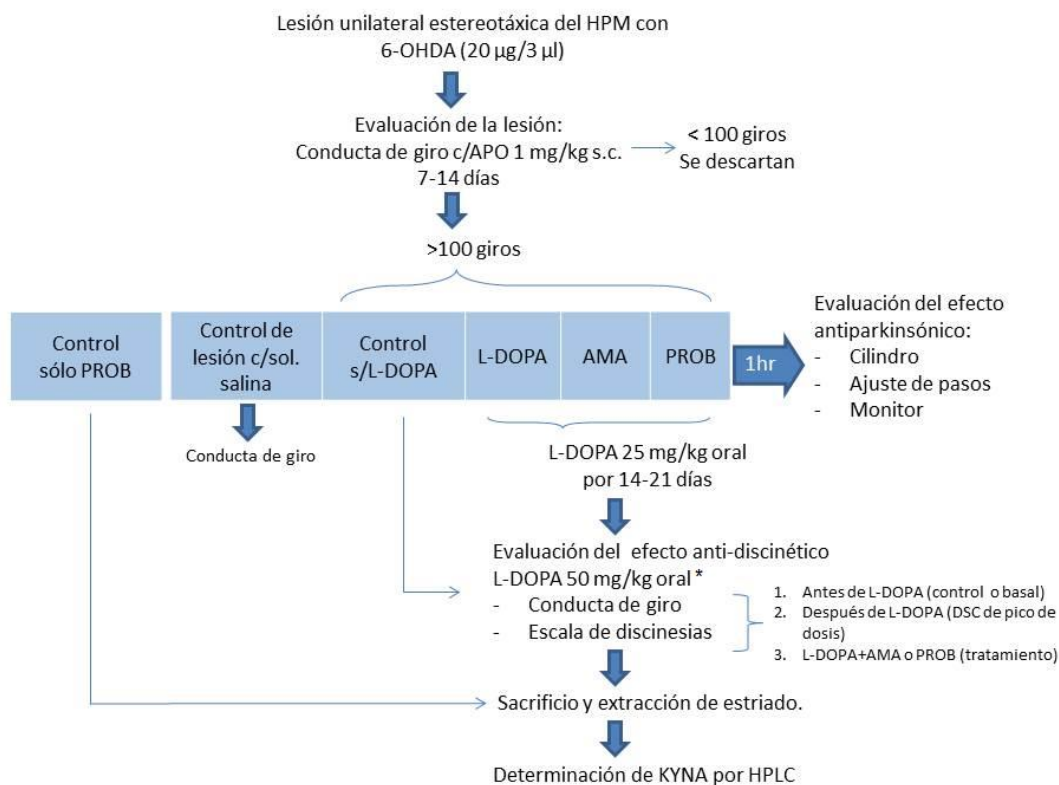


Figura 9. Flujograma temporal de la metodología general. Haz prosencefálico medial (HPM); 6-hidroxidopamina (6-OHDA); Apomorfina (APO); Probenecid (PROB); Levodopa (L-DOPA); Amantadina (AMA); Ácido kinurénico (KYNA); Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); Discinesias (DSC). *Se utilizó una dosis alta de L-DOPA (50 mg/kg) como un parámetro para estimar los efectos antidiscinéticos.

8.1. Lesión en haz proscencefálico medial con 6-OHDA.

Previa anestesia general de los animales usando pentobarbital (50mg/Kg i.p.), la 6-OHDA o vehículo se administró mediante cirugía estereotáxica en el HPM derecho utilizando una microjeringa Hamilton de 10 µL, y empleando las siguientes coordenadas estereotáxicas en relación a Bregma (Paxinos & Watson, 2005): AP: -4.4 mm; Lat: -1.2mm; Ventral: -7.8mm (Figura 10), se administró una dosis total de 20 µg de 6-OHDA en un volumen total de 3µL disuelta en ácido ascórbico al 0.02% según lo reportado previamente (Silva-Adaya *et al.*, 2010; Carrillo-Mora *et al.*, 2010; Santamaría *et al.*, 1996). La administración del volumen se realizó durante 10 min dejando la aguja durante

lesionados con 6-OHDA que presentaron más de 100 giros en media hora fueron seleccionados para continuar en el experimento. Los que presentaron menos de este número de giros se re-evaluaron una semana después, y si para esta momento continuaban con <100 giros, los animales eran descartados.

8.3. Evaluación conductual del hemiparkinsonismo.

En los animales seleccionados, 24 horas después de la evaluación de la conducta de giro, se realizó la evaluación conductual de los efectos de los fármacos sobre el parkinsonismo. Se realizaron tres pruebas motoras: prueba del cilindro, ajuste de pasos y monitor de actividad espontánea en campo abierto. Dichas evaluaciones se realizaron 30-60 min después de una sola administración, ya sea oral (L-DOPA 25mg/Kg ó AMA 40 mg/Kg), o intraperitoneal (i.p.; PROB 75mg/Kg) de los fármacos.

1- *Prueba de la utilización dominante espontánea de las extremidades anteriores* (Prueba del cilindro). Esta prueba se empleó para evidenciar la utilización asimétrica de las extremidades anteriores que ocurre de manera secundaria a la rigidez y bradicinesia generada por el hemiparkinsonismo. Esta prueba depende de la actividad exploratoria espontánea de los roedores y brevemente, consiste en colocar (sin habituación previa) cada uno de los animales en un cilindro de acrílico transparente de 50 cm de altura y 25 cm de diámetro, durante 5 minutos y contabilizando el número de contactos que el animal realiza con las extremidades anteriores en las paredes del dispositivo cada vez que el animal se levanta manteniéndose sobre sus extremidades posteriores (*rearing*), anotando si se el contacto se realizó con la extremidad derecha, izquierda o ambas, para al final establecer la existencia de un predominio en la utilización de alguna de las extremidades según el número de contactos totales (Figura 11).

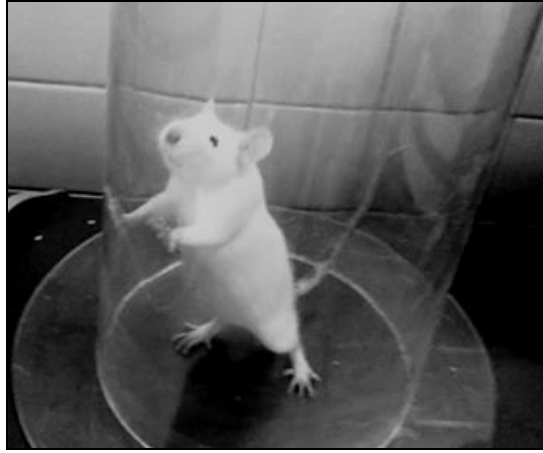


Figura 11. Prueba de la utilización dominante espontánea de las extremidades anteriores (prueba del cilindro).

2- *Prueba de la evaluación cualitativa de ajuste de pasos.* Se utilizó esta prueba como una muestra indirecta de la alteración de los reflejos posturales y la rigidez de las extremidades anteriores. Para esta prueba se toma al animal de experimentación y se coloca sobre la superficie plana y lisa de una mesa de 1 metro de longitud, y así se le obliga a realizar sobre sus extremidades anteriores un desplazamiento lateral sobre dicha superficie, primero de izquierda a derecha (evalúa la extremidad derecha) y luego en sentido contrario (evalúa la extremidad izquierda), para que el animal realice los ajustes automáticos en la longitud y sentido de los pasos según el desplazamiento forzado. Dicha maniobra se realiza en 4 ocasiones promediando el número de ajustes realizados de cada extremidad (Figura 12).



Figura 12. Prueba de la evaluación cualitativa de ajuste de pasos

3- *Evaluación en monitor de actividad espontánea.* (Versamax Activity Monitor, AccuScan Instruments Inc. Columbus Ohio). El monitor de actividad espontánea (Figura 13) es un dispositivo automatizado basado en sensores infrarrojos de movimiento colocados en las paredes de un cubo de acrílico transparente de 42x42x32 cm. de altura, y del cual se obtienen, de forma automática 17 parámetros cuantitativos de actividad locomotora espontánea (distancia total recorrida, movimientos horizontales, movimientos verticales, actividad estereotipada, etc.) organizados en bloques de tiempo predeterminados.

La evaluación de actividad motora espontánea se realizó durante 30 min en una habitación separada, de aproximadamente 4 m de largo, por 3 m de ancho, con las ventanas recubiertas para evitar la entrada de luz exterior y con aislamiento sonoro. Todas las evaluaciones se realizaron dentro de un rango de horario entre las 9:00 y las 13:00 hrs y con condiciones de baja iluminación artificial.

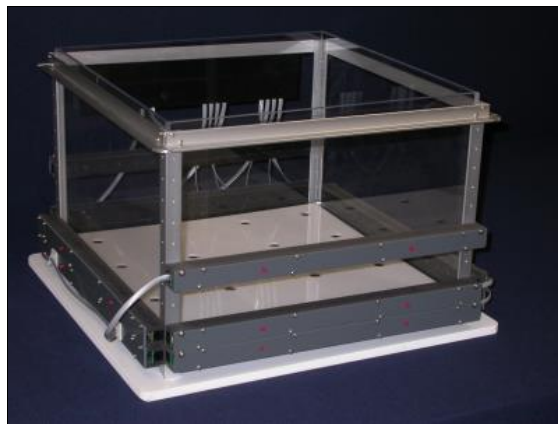


Figura 13. Fotografía de la caja de evaluación del monitor de actividad motora espontánea (Versamax Activity Monitor AccuScan Instruments).

8.4. Administración de levodopa/carbidopa v.o. para el desarrollo de discinesias.

Los animales que fueron previamente evaluados en las pruebas motoras, 24 horas después comenzaron con el régimen de administración diaria de L-DOPA o vehículo por vía oral. En primer término, y antes de cada administración oral de L-DOPA, a los animales se les retiró el alimento con tres horas de anticipación para evitar que el alimento pudiera competir con la absorción oral de la L-DOPA. La L-DOPA o el vehículo se administró utilizando una sonda orogástrica plástica de tipo Levin de 6-8 Fr. La dosis de L-DOPA que se administró fue de 25 mg/Kg/día, todos los días, hasta que el animal desarrolló de manera consistente algún tipo de discinesia (dos a tres semanas en promedio), después de la administración oral de L-DOPA (discinesia de pico de dosis). Para lo anterior se utilizó la formulación comercial Cloisone © tabletas (Psicofarma® S.A. de C.V. México), que contiene levodopa y el inhibidor de la descarboxilasa periférica: carbidopa, en una relación de 10:1 (levodopa 250 mg/carbidopa 25mg). La tableta fue triturada y disuelta previamente en agua, y preparada minutos antes de cada administración.

8.5. Evaluación de las discinesias motoras.

Para la evaluación de las DSC se realizó una evaluación visual cualitativa y cuantitativa y además la cuantificación de la conducta de giro inducida por una dosis elevada de L-DOPA.

8.6. Evaluación visual cualitativa y cuantitativa de las discinesias.

La evaluación de DSC se llevó a cabo visualmente cada 15 min durante 2 horas después de la administración oral de L-DOPA (50mg/kg; se utilizó una dosis alta como parámetro para estimar los efectos antidiscinéticos de la AMA y el PROB). Para la cuantificación final de la escala de DSC se consideró la totalidad de las discinesias

observadas y el promedio de su severidad durante las 2 horas. En los grupos de tratamiento, la evaluación de la escala se realizó de la misma forma administrando simultáneamente los fármacos, ya sea AMA (40 mg/kg v.o.) ó PROB (75 mg/kg i.p.) junto con la dosis oral de L-DOPA.

Para la cuantificación de las DSC se tomaron los siguientes criterios según se ha reportado previamente (Cenci *et al.*, 1998)

Criterios para la caracterización de discinesias (DSC)

- 1) Los movimientos son inducidos por administración L-DOPA.
- 2) Afectan el lado contralateral a la lesión por 6-OHDA.
- 3) Son repetitivos, sin propósito, y no pertenecen a ningún patrón de conducta normal.

Subtipos según topografía y velocidad

- 1) Discinesia locomotora: incremento de la locomoción con tendencia del movimiento hacia el lado contralateral al lesionado.
- 2) Distonia axial: Torsión persistente contralateral de la cabeza o del segmento superior del cuerpo.
- 3) Discinesia orolingual: Movimientos mandibulares estereotipados y protrusión continua y repetitiva de la lengua hacia el lado contralateral.
- 4) Discinesia de las extremidades: Sacudidas rítmicas o posturas distónicas de las extremidades contralaterales, o movimiento excesivo de las extremidades contralaterales respecto de las ipsilaterales.

Escala de severidad:

- Grado 1. Ocasionales.
- Grado 2. Frecuentes.
- Grado 3. Continuas pero interrumpidas mediante estimulación sensorial.
- Grado 4. Continuas severas y sin interrupción

8.7. Evaluación de la conducta de giro inducida por L-DOPA.

Debido a que en estudios previos en modelos de hemiparkinsonismo inducido por 6-OHDA en roedores, se ha demostrado que el desarrollo de conducta de giro después de la administración de L-DOPA (u otros agonistas dopaminérgicos), está estrechamente relacionado con el desarrollo de DSC (Konitsiotis & Tsironis, 2006); en el presente estudio también se utilizó la cuantificación de los giros contralaterales durante una hora después de la administración de una dosis alta de L-DOPA (50mg/Kg), y además se realizó la cuantificación repetida del número de giros durante 5 min cada 15min hasta que desapareció la conducta de giro (3 horas aprox.), con la finalidad de establecer el perfil temporal del efecto de los fármacos.

8.8. Evaluación del contenido estriatal total de ácido kinurénico por HPLC.

Con la finalidad de tratar de correlacionar los niveles estriatales totales de KYNA con los efectos antidiscinéticos mostrados por el PROB y la AMA, se tomó en consideración el perfil temporal de la conducta de giro; se realizó una nueva administración de L-DOPA (50mg/kg) y los otros fármacos, y en el momento del efecto máximo de reducción de la conducta de giro (aprox. 90 min) se realizó sacrificio por decapitación, inmediatamente se extrajo el cerebro, y se obtuvo el estriado mediante disección selectiva en frío. Éste fue procesado para la determinación de KYNA total mediante HPLC.

8.9. Determinación de ácido kinurénico por HPLC.

La presencia de KYNA en los ensayos *ex vivo* fue evaluada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) mediante el método de fase reversa con una fase estacionaria no polar (columna HR-80; ESA, Thermo Scientific, USA), y una fase móvil polar que contiene acetato de zinc 250 mM, acetato de sodio 50 mM y acetonitrilo 3% en un pH final de 6.2 ajustado con ácido acético glacial. El método se lleva a cabo con un flujo de 1 ml / min con fase isocrática. El tiempo de retención de KYNA es en el minuto 7, y se detectó por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 344 nm, y de emisión 398 nm. Para el método se empleó una bomba binaria LC Flexar S200, un automuestreador Flexar S200 y un detector de fluorescencia 200^a (Perkin Elmer, USA) (Wu et al.1992). Para la cuantificación final se realizó una interpolación de una curva estándar de KYNA corregida para el contenido de proteína de cada una de las muestras expresado en fmoles de KYNA/mg de proteína.

9. Resultados.

9.1. Evaluación conductual del efecto antiparkinsoniano de los fármacos.

9.1.1. Prueba de ajuste de pasos.

En el grupo Control se observó un número de pasos ajustados muy similares para ambas extremidades anteriores (18 pasos en promedio), sin embargo, en el grupo lesionado con 6-OHDA, se observa disminución significativa del 20% en el número de pasos ajustados en la extremidad anterior izquierda con respecto a la extremidad derecha (Figura 14). En el grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA la administración de L-DOPA produce un incremento significativo del 260% en el número de pasos ajustados en la extremidad afectada respecto de los animales lesionados que no recibieron L-DOPA (Figura 14). La administración de AMA en las ratas lesionadas de la misma forma produjo incremento significativo del 200% en el número de pasos ajustados realizados con la extremidad afectada (Figura 14), y es con la administración de PROB que éste incremento (466%) en el ajuste de pasos con la extremidad lesionada, además de

significativo, fue superior que el mostrado por L-DOPA y AMA (Figura 14). La figura 15 condensa los resultados del número de pasos ajustados solo de la extremidad afectada en todos los grupos.

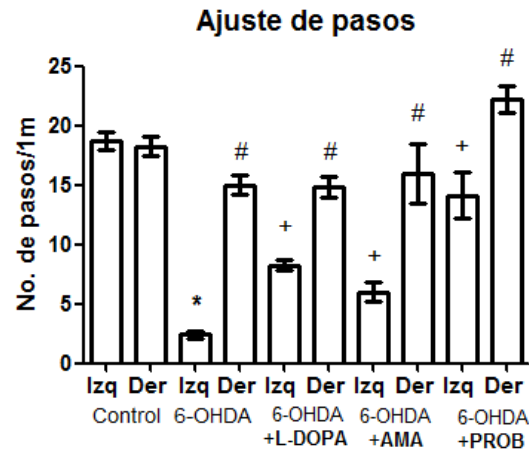


Figura 14. Prueba de ajuste de pasos. La gráfica representa el promedio \pm error estándar de pasos ajustados por individuo por grupo con cada extremidad. *Izq 6-OHDA vs. Izq control. +Izq 6-OHDA vs. Izq. con tratamiento. #Izq con tratamiento vs. Der con tratamiento. (ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple Bonferroni $p < 0.05$ $n = 5$).

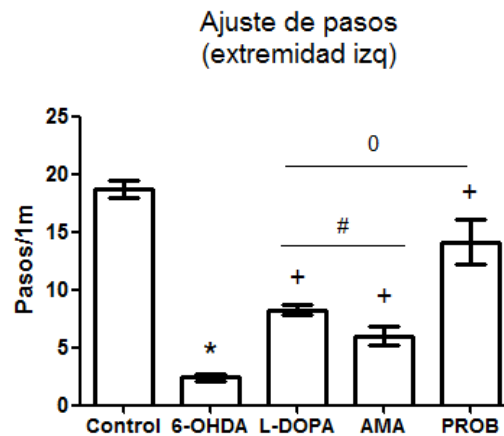


Figura 15. Prueba de ajuste de pasos. Comparación en el uso de la extremidad izquierda en los diferentes grupos de tratamiento (media \pm error estándar). * vs. control; + vs. 6-OHDA; # L-DOPA vs. AMA; ° vs PROB (ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple Bonferroni $p < 0.05$ $n = 5$)

9.1.2. Prueba de cilindro.

En esta prueba se observa que en el grupo control, el número de contactos realizados con la extremidad derecha es similar al número de contactos realizados con la extremidad izquierda; igualmente el número de contactos realizados con ambas extremidades simultáneamente es semejante al realizado individualmente, es decir, con cada una de las extremidades (Figura 16).

En el grupo lesionado con 6-OHDA existe una asimetría en el uso de las extremidades. Disminuye significativamente el número de contactos realizados con la extremidad izquierda mientras que los contactos realizados con la extremidad derecha aumentan. El uso simultáneo de ambas extremidades también disminuye (Figura 17 A).

Con la administración de L-DOPA, AMA y PROB el uso asimétrico desaparece debido a que aumenta el número de contactos realizados con la extremidad izquierda (Figura 17 B, C, D).

La figura 18 muestra el porcentaje de utilización de la extremidad izquierda. El grupo control presenta un 50% de uso de ésta, en el grupo de 6-OHDA el porcentaje disminuye significativamente al 20% (ANOVA de una vía $p < 0.05$). El porcentaje aumenta significativamente al 43% con la administración de L-DOPA (ANOVA de una vía $p < 0.05$), al 40% con la administración de AMA (ANOVA de una vía $p < 0.05$) y al 45% con la administración de PROB (ANOVA de una vía $p < 0.05$; Figura 18).

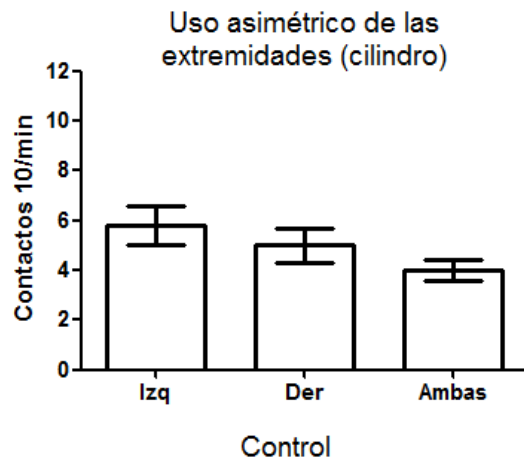


Figura 16. Prueba de cilindro. Número de contactos realizados con ambas y con cada una de las extremidades (media \pm error estándar). El uso de las extremidades es simétrico en ratas no lesionadas (ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple Bonferroni $p < 0.05$ $n = 5$)

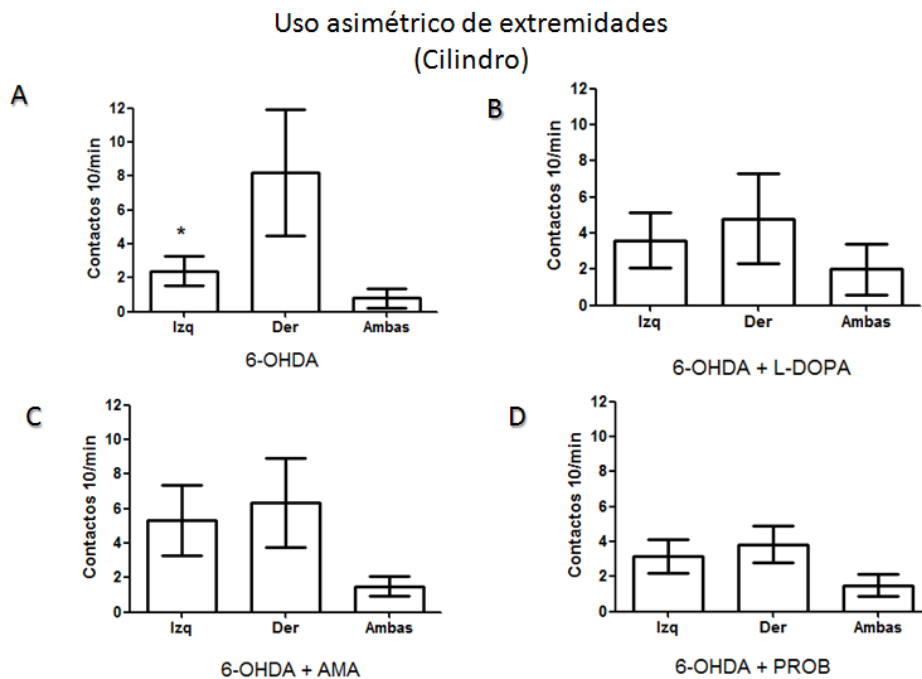


Figura 17. Prueba del cilindro. En las gráficas se representa el promedio \pm error estándar del número de contactos con las extremidades anteriores en los diferentes grupos. El uso de las extremidades es asimétrico en el grupo lesionado con 6-OHDA (A); en los grupos de tratamiento dicha asimetría desaparece (B, C, D) * Izq vs. Der. (t de student $p = 0.01$; $n = 5-6$)

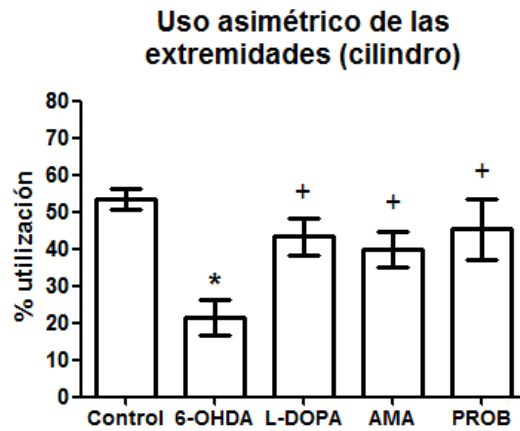


Figura 18. Prueba de cilindro. Porcentaje \pm error estándar de utilización de la extremidad izquierda. El porcentaje disminuye en ratas lesionadas y aumenta después de cada tratamiento. * vs. control; + vs. 6-OHDA (ANOVA una vía seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni $p < 0.05$ $n = 5$)

9.1.3. Monitor de actividad espontánea.

Durante la prueba del monitor de actividad espontánea, la medición de distancia total recorrida presenta una gran variabilidad entre los distintos grupos de tratamiento, se observa aparentemente una tendencia a la disminución de la distancia total recorrida en el grupo lesionado con 6-OHDA y en el grupo que recibió AMA, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 19 A).

Los movimientos verticales disminuyen significativamente después de la lesión con 6-OHDA (ANOVA de una vía $p < 0.05$), sin embargo, la administración de los tres diferentes tratamientos (L-DOPA, AMA y PROB) no incrementó significativamente el número de movimientos verticales en los animales lesionados (Figura 19 B).

Finalmente, la lesión con 6-OHDA aumenta significativamente los movimientos estereotipados, y al administrar L-DOPA, AMA y PROB estos se reducen significativamente (ANOVA de una vía $p < 0.05$), sin embargo, no se observa una diferencia significativa entre el efecto de los tres diferentes tratamientos. (Figura 19 C).

Monitor de actividad Espontánea

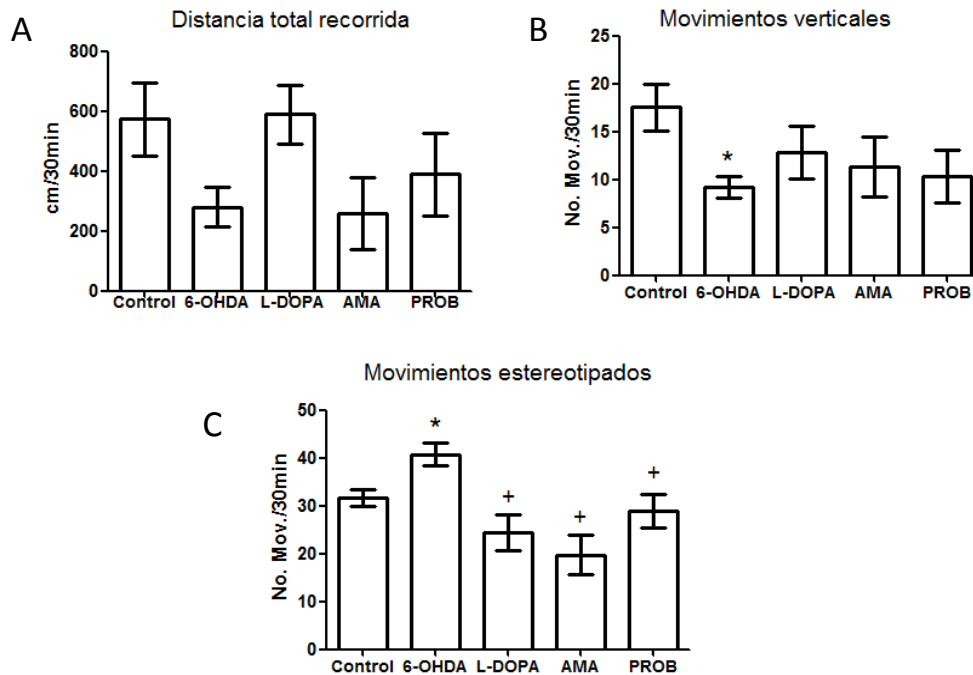


Figura 19. Las gráficas muestran diferentes parámetros de medición del monitor de actividad espontánea (media \pm error estándar). A) No hay diferencia significativa en la distancia total recorrida de cada grupo. B) Los movimientos verticales en el grupo de 6-OHDA disminuyen significativamente en comparación con el grupo control. C) Los movimientos estereotipados aumentan significativamente en el grupo 6-OHDA en comparación con el control y disminuyen de manera significativa con los tratamientos en comparación con 6-OHDA. * 6-OHDA vs. control + 6-OHDA vs. tratamientos (ANOVA una vía seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni $p < 0.05$ $n = 5$).

9.2. Evaluación conductual del efecto antidiscinético de los fármacos.

9.2.1. Discinesias.

Como es esperado, después de una dosis oral elevada de L-DOPA el grupo control no presenta discinesias, mientras que los grupos con tratamiento de L-DOPA presentan por lo menos alguno de los subtipos de las mismas (Figura 20 A).

El grupo de L-DOPA presenta severidad de grado 2, con base en la escala propuesta por Cenci et al., (1998); después de administrar AMA, la severidad no disminuye significativamente, en cambio, después de administrar PROB, la severidad disminuye de manera significativa a grado 1 (Figura 20 B).

Las DSC más frecuentes fueron las orolinguales y de extremidades. Las orolinguales se presentan en grado 2 después de administrada la L-DOPA, no se observan diferencias con la administración de AMA pero después de la administración de PROB se observa un cambio significativo a un grado promedio de 1.5 (Figura 20 C).

Las DSC de extremidades se presentan en grado promedio de 2.5 después del tratamiento con L-DOPA. No se observa diferencia significativa con la administración de AMA. Con la administración de PROB se observa una disminución significativa a grado 1 (Figura 20 D).

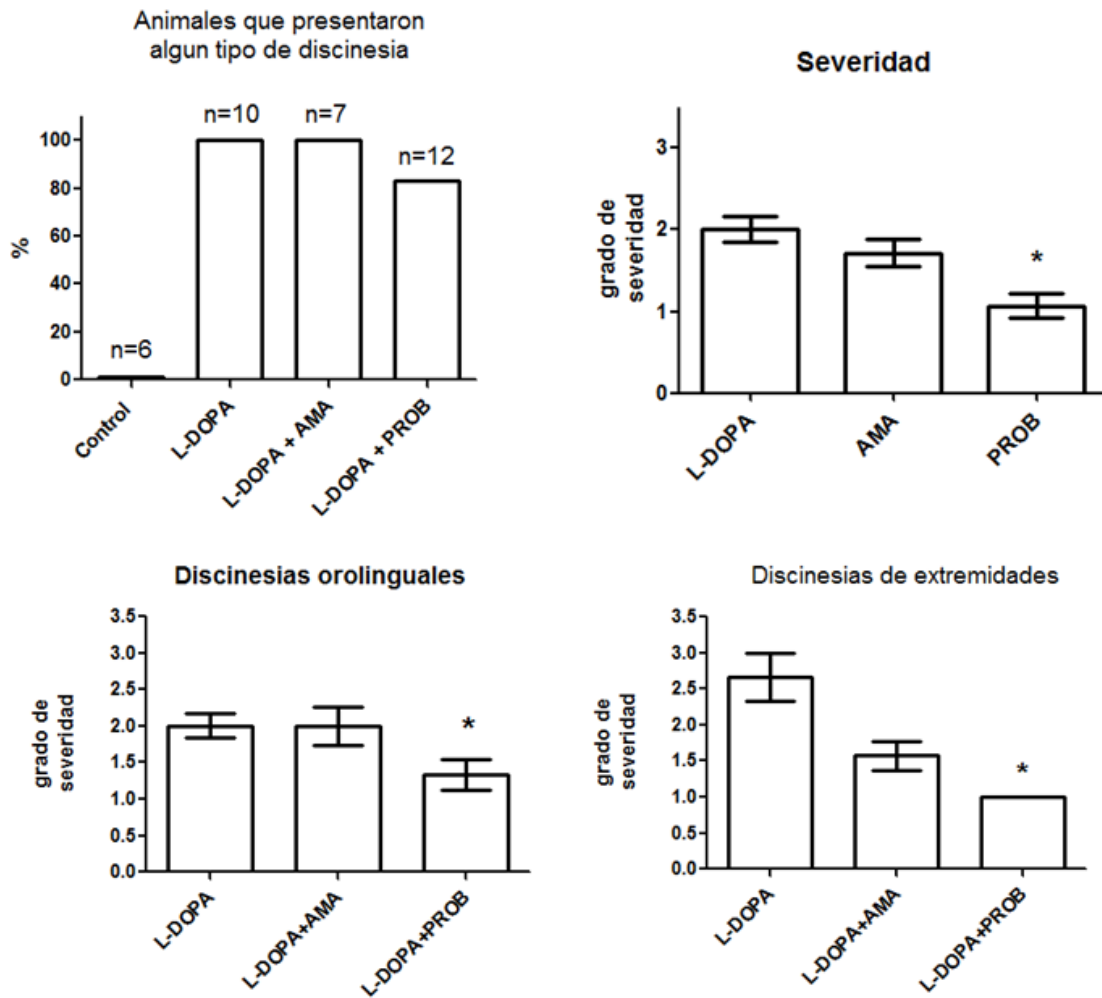


Figura 20. Se muestran los resultados de la escala cuantitativa de DSC en todos los grupos (media \pm error estándar) A) Presencia de DSC por grupo. B) Severidad global con que se presentaron las DSC. El PROB disminuye significativamente las DSC en comparación con el grupo de L-DOPA. C) y D) muestran la severidad de las DSC según el tipo de discinesia (orolingual o de extremidades), observando una disminución significativa de la severidad con la administración de PROB respecto de L-DOPA. * PROB vs. L-DOPA (ANOVA una vía seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni $p < 0.05$ $n=6$).

9.2.2. Conducta de giro inducida por levodopa.

Como es esperado, el grupo control no presenta giros, mientras que el grupo de 6-OHDA presenta más de 200 giros en una hora. Después de la administración de PROB, se observa una disminución significativa en el número de giros, así como con la administración de AMA (ANOVA de una vía $p < 0.05$; Figura 21).

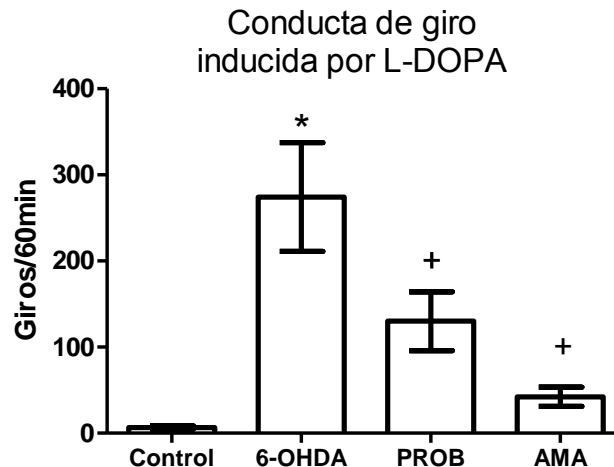


Figura 21. Conducta de giro inducido por la administración de L-Dopa. Número de giros durante una hora (media \pm error estándar). * 6-OHDA vs. control; + tratamiento vs. 6-OHDA (ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni $p < 0.05$ $n=6$).

9.2.3. Perfil temporal de la conducta de giro

La figura 22 muestra el perfil temporal de la conducta de giro tras la administración de una dosis alta de L-DOPA, y el momento en que se presentan los efectos de los fármacos sobre la misma. El pico del efecto de la dosis de L-DOPA se observa a los 60 min con un máximo de 110 giros en 5 min en promedio. Los fármacos (AMA y PROB) fueron administrados entre los 45-60 min (Figura 22).

El número de giros disminuye de manera significativa, 45 min después de la administración de PROB y su efecto permanece durante las siguientes dos horas (Figura 22).

Los efectos después de la administración de AMA se observan en promedio a los 60 min y disminuyen de manera paulatina hasta las 3 hrs.

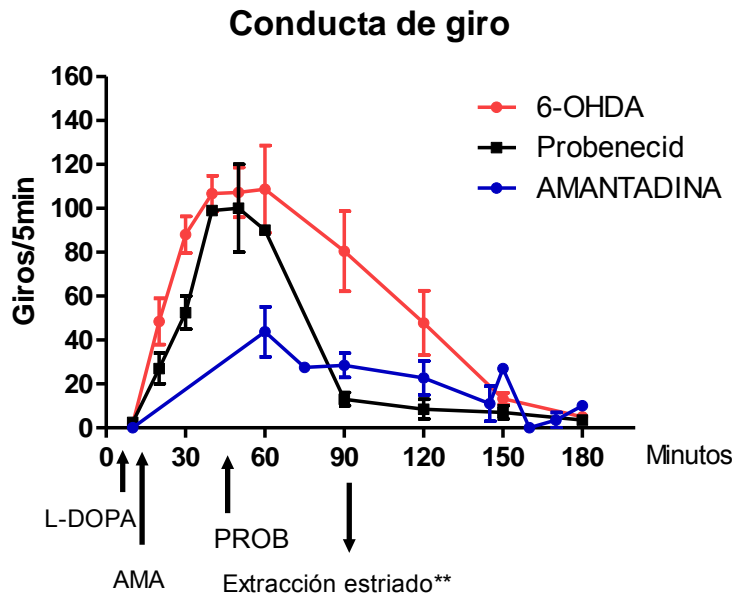


Figura 22. La gráfica muestra el perfil temporal de los efectos de los fármacos sobre la conducta de giro inducida por L-DOPA. Después de la administración de L-DOPA se observa un pico máximo de giros a los 60 min, disminuyendo paulatinamente y desapareciendo a las 3 horas. Con la administración de PROB en el pico de giros, se observa disminución significativa de los giros aprox. 45 min después de la administración de este fármaco, con una duración del efecto de dos horas. La AMA se administró junto con la L-DOPA, observando el efecto a los 60 min, disminuyendo de manera lenta hasta las 3 horas. **Una vez determinado éste curso temporal, la extracción de estradiol se realizó en un día posterior con las respectivas administraciones.

9.3. Determinación de niveles de ácido kinurénico por HPLC.

Al medir por HPLC los niveles estriatales de KYNA se observa que el grupo lesionado con 6-OHDA no presenta diferencia significativa en los niveles de KYNA con respecto al

grupo control. Por otro lado, se observa que el PROB por sí solo aumenta los niveles de KYNA así como después de la lesión con 6-OHDA (Figura 23).

La administración de L-DOPA después de la lesión, así como los tratamientos posteriores la administración de L-DOPA (PROB y AMA) no modifican significativamente los niveles de KYNA estriatales.

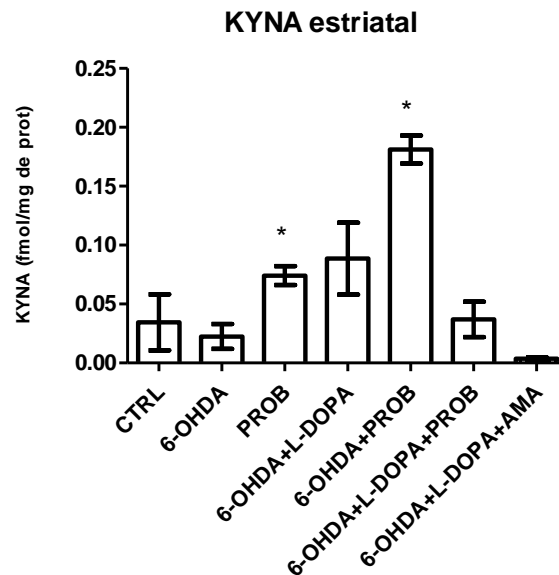


Figura 23. Se muestran los niveles de KYNA estriatal total. Los niveles de KYNA no se modifican significativamente después de la lesión con 6-OHDA. Después de la administración i.p. de PROB, los niveles de KYNA basales tienden a aumentar respecto al grupo control y aumentan significativamente respecto del grupo lesionado. En los animales lesionados la administración de PROB aumenta significativamente los niveles de KYNA, mientras que en los grupos administrados con L-DOPA/PROB y L-DOPA/AMA, no hay diferencia significativa en los niveles KYNA con respecto al grupo lesionado. * vs. 6-OHDA (ANOVA una vía seguido de una prueba de comparación múltiple Bonferroni $p < 0.05$ $n=6$).

10. Discusión.

La muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc del mesencéfalo en la EP conlleva a la disminución en la producción de la DA necesaria para la regulación del circuito fronto-basal esquelito-motor involucrado en la regulación de los movimientos voluntarios (Blandini *et al.*, 2000). Esta deficiencia se puede contrarrestar utilizando el precursor de DA: la L-3,4 dihidroxi fenilalanina o L-DOPA (Olanow *et al.*, 2009). Sin embargo, desde hace más de una década se sabe que su uso prolongado en la EP se asocia con el desarrollo de diversas complicaciones clínicas, como las fluctuaciones motoras y las DSC (Ahlskog *et al.*, 2001). Las DSC son movimientos anormales e involuntarios de distribución e intensidad variable, que suelen presentarse o coincidir con el pico de concentración máxima de la L-DOPA. Por lo que, las DSC también coinciden con el momento del máximo efecto clínico positivo de la L-DOPA sobre la bradicinesia (Fabbrini *et al.*, 2007). Es por eso que las DSC afectan de forma muy importante la calidad de vida de los pacientes, y así mismo, merman significativamente la utilidad clínica de la L-DOPA en los pacientes que se encuentran en etapas avanzadas de la enfermedad (Hinson, 2010).

El manejo de las DSC requiere de diversos cambios y ajustes en la administración de L-DOPA, y con frecuencia se requiere de adicionar un fármaco que ayude al control de las mismas. A la fecha gran diversidad de fármacos con muy diversos mecanismos de acción han sido probados para el control de las DSC, sin embargo, uno de los que han resultado más eficaces son los antagonistas NMDA (Gottwald *et al.*, 2011).

No obstante, uno de los problemas más importantes que presentan los antagonistas NMDA de origen sintético para su aplicabilidad clínica, es la gran variedad de efectos colaterales que han sido reportados (Chen *et al.*, 2006). Por lo cual, la búsqueda de una

antagonista NMDA que resulte, suficientemente selectivo, así como clínicamente seguro y eficaz continúa hasta la fecha.

En este sentido el KYNA es un producto del catabolismo del triptófano (vía de la kinurenina) y hasta el momento es el único antagonista endógeno del rNMDA que se conoce. Estudios previos sugieren que su perfil de efectos colaterales es muy distinto del mostrado por otros antagonistas del NMDA (Parsons *et al.*, 1997), y existe amplia evidencia sobre sus efectos anticonvulsivos e incluso neuroprotectores y antioxidantes (Foster *et al.*, 1984; Goda *et al.*, 1999; Carrillo-Mora *et al.*, 2010; Lugo-Huitron *et al.*, 2011; Zsizsik *et al.*, 2002).

Por otra parte, estudios previos han demostrado que a través de distintas estrategias farmacológicas es posible incrementar la producción endógena cerebral del KYNA, o inhibir su eliminación con el uso de Probenecid (PROB; Stone, 2000).

En el presente trabajo se estudiaron por primera vez los efectos conductuales del PROB sobre el parkinsonismo y las DSC inducidas por L-DOPA, en un modelo de hemiparkinsonismo en ratas, comparándolo con los efectos de la L-DOPA y un antagonista NMDA que ha sido ampliamente utilizado en el manejo de las DSC en pacientes con EP: la AMA. Finalmente se midieron los niveles estriatales de KYNA con la finalidad de conocer si existía alguna relación de sus niveles con los efectos observados.

Efectos antiparkinsónicos.

En el presente estudio se encontró que en dos de las tres pruebas conductuales utilizadas para evaluar los efectos antiparkinsónicos se observó mejoría significativa de la asimetría motora producida por la lesión con 6-OHDA con los tres fármacos probados L-DOPA, AMA y PROB.

El efecto positivo observado de la L-DOPA resulta obvio y esperable ya que ésta actúa como un precursor de DA en los ganglios basales que ayuda a contrarrestar la deficiencia ocasionada por la EP (Olanow *et al.*, 2009). Es por eso que la L-DOPA es el tratamiento que más ofrece mejoría a los pacientes con EP.

Por otra parte, los efectos antiparkinsónicos de la AMA han sido ampliamente reportados con anterioridad. Por otro lado, aunque los mecanismos de acción involucrados en dicho efecto no se conocen con toda precisión se han demostrado varios mecanismos posibles: inhibición de la recaptura de DA y noradrenalina (NA), estimulación de la liberación de catecolaminas, estimulación de la síntesis de DA e incluso la interacción directa con receptores de DA (Mizoguchi *et al.*, 1994; Jackisch *et al.*, 1992; Sommerauer *et al.*, 2012).

En el presente estudio, en la prueba de ajuste de pasos, el menor efecto positivo se observó precisamente con el tratamiento con AMA, la causa de esta baja actividad antiparkinsónica puede estar relacionada con que su mecanismo de acción principal en la EP en realidad no depende de su acción sobre la DA, sino sobre otras catecolaminas como la NA, o debido a su antagonismo sobre los rNMDA, lo cual de manera indirecta, puede afectar la liberación de DA (Sommerauer *et al.*, 2012). Por otra parte, un meta-análisis enfocado a reportar los efectos clínicos de la AMA en la EP, sugiere que no existe evidencia contundente sobre sus efectos sobre el parkinsonismo (Crosby *et al.*, 2003).

En la prueba de ajuste de pasos, el PROB es el que presentó un efecto mayor en comparación con los otros tratamientos (L-DOPA y AMA), y además mostró que el uso de las extremidades después del tratamiento, incluso se asemeja de manera significativa al comportamiento de ratas sanas. En cuanto a la prueba de cilindro, la administración de PROB presentó un efecto positivo significativo, pero aquí, el porcentaje de utilización se asemejó al observado con los otros tratamientos. El motivo de esta divergencia de

resultados entre las dos pruebas de asimetría motora utilizadas puede deberse a que en realidad las dos pruebas difieren de forma importante en lo que impulsa la conducta del animal en cada una: en la prueba de ajuste de pasos, el animal es en realidad forzado a utilizar sus extremidades para realizar un movimiento que no le resulta espontáneo (ajuste de paso); a diferencia de la prueba de cilindro, en donde el número de contactos dependen del interés exploratorio espontáneo que muestra el animal dentro del cilindro, lo cual puede hacer que ambos resultados no sean del todo comparables.

Con respecto del mecanismo por el cual el PROB puede estar mejorando los síntomas parkinsonianos, se ha demostrado que la co-administración de PROB con diferentes fármacos retrasa la eliminación de éstos tanto del sistema nervioso como de la circulación (Hesselink *et al.*, 1999) debido a que previene el transporte activo de los ácidos orgánicos (Taylor *et al.*, 1992) y otros transportadores como las MRPs (Gao *et al.*, 1998). En este sentido, estudios previos han demostrado que el PROB es capaz de incrementar los niveles de DOPAC y HVA en el líquido cerebro-espinal de macacos, por lo cual dicha acumulación puede alterar el metabolismo de la DA, aumentando quizá sus niveles estriatales (Bacopoulos *et al.*, 1978; Elghozi *et al.*, 1983). Por otro lado, en un reporte previo que estudió por electrofisiología la actividad de las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (ATV), se observó aumento de la descarga de estas neuronas en respuesta a la administración sistémica de kinurena y PROB (Nilsson *et al.*, 2006). En estudios posteriores se comprobó que la elevación de KYNA aumenta la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del ATV y de la sustancia negra, y que dicho efecto se revertía al usar d-cicloserina (un agonista parcial de los rNMDA), lo cual apoya que el efecto está mediado por el bloqueo de los rNMDA (Erhardt *et al.*, 2002; Erhardt *et al.*, 2001). Al observar mayor eficacia sobre la disminución de los síntomas parkinsonianos, se podría sugerir que la administración de PROB está participando en la modulación de la VK acumulando KYNA, ya sea actuando sobre los transportadores de ácidos orgánicos o sobre las MRPs.

En la evaluación con el monitor de actividad espontánea se evaluaron tres parámetros: movimientos estereotipados, movimientos verticales y distancia total recorrida. Y solamente sobre los movimientos estereotipados se observó diferencia entre los diferentes tratamientos. Una vez más fue el PROB el que tuvo mayor efecto en comparación con los tratamientos de L-DOPA y AMA. A diferencia de los movimientos estereotipados, los movimientos verticales así como la distancia total recorrida son conductas de exploración que, en general no se ven afectadas significativamente después de la lesión con 6-OHDA (Weissenborn *et al.*, 1992). Por otro lado, el monitor de actividad espontánea, es un equipo que evalúa predominantemente la conducta locomotora de forma global, por lo que es posible que no resulte sensible para la detección de la asimetría motora que produce el modelo de lesión con 6-OHDA.

Efectos antidiscinéticos.

Se observó que el 100% de los animales tratados con L-DOPA desarrollan DSC, las cuales no desaparecen después de una dosis de AMA, sin embargo, después de la administración de PROB, el porcentaje de animales con DIL disminuyó un 20%. La severidad se redujo únicamente después del uso de PROB. Estos resultados son similares a los obtenidos sobre el parkinsonismo, siendo el PROB el que tiene mayor efecto positivo y significativo. Una dosis única de AMA no es suficiente para contrarrestar los efectos de la administración crónica de L-Dopa, a diferencia del PROB.

La acumulación de KYNA en el cerebro ha mostrado tener efectos neuroprotectores atribuidos a su efecto antagonista sobre los rNMDA y $\alpha 7$ -nicotínicos (Reyes Ocampo *et al.*, 2014). Bloquear los receptores NMDA provoca modificaciones en la liberación de glutamato y por lo tanto genera un efecto dentro de la vía de los ganglios basales que ha sido afectada. El efecto sobre los rNMDA podría ser también, un efecto indirecto debido a que la acumulación de KYNA y otros ácidos orgánicos generan cambios en el pH

extracelular, y se ha observado que dichos cambios están involucrados en la modulación de la actividad de estos receptores (Tang *et al.*, 1990). Por otro lado, la efectividad del PROB podría implicar la participación de otros mecanismos tales como la inhibición de los canales de Pannexina 1, proteínas transmembranales que tienen como función el intercambio de moléculas entre el citoplasma y el espacio extracelular y en especial la liberación de ATP, que durante los procesos de inflamación actúa como mensajero. Por lo que la inhibición selectiva de estos canales propone una respuesta antiinflamatoria del PROB (Silverman *et al.*, 2008).

KYNA estriatal.

Inicialmente se propone que los efectos antiparkinsonianos y antidiscinéticos producidos por la administración de PROB están relacionados con las concentraciones de KYNA que se acumulan en el cerebro después de la administración del fármaco mencionado.

Se ha propuesto que los niveles de KYNA disminuyen cuando los niveles de DA aumentan y viceversa (Okuno *et al.*, 2011). Esto nos llevaría a pensar que al lesionar con 6-OHDA, la DA está disminuyendo y por lo tanto las concentraciones de KYNA serán mayores, que al administrar un tratamiento precursor de DA, el KYNA estará disminuyendo y que la administración de un inhibidor del transporte de ácidos orgánicos acumulará KYNA disminuyendo las concentraciones altas de DA ejercidas previamente por estos fármacos.

Debido a que el PROB mostró tener un efecto positivo, se realizó la determinación de los niveles de KYNA por HPLC, en donde se observó que las diferencias entre grupos no son significativas, con excepción del grupo lesionado contra el grupo control de PROB y contra el grupo lesionado con tratamiento de PROB. Se podría decir que al disminuir los niveles de DA con la lesión, los niveles de KYNA están aumentando, sin embargo observamos que el PROB aumenta por si solo los niveles de KYNA, lo que lleva a

cuestionarnos si el mecanismo por el cual se regulan los niveles de KYNA están relacionados directamente con la actividad dopaminérgica.

Hasta el momento, los estudios realizados con respecto a esta relación KYNA-DA se han basado en la modulación de los niveles de KYNA por diferentes métodos como son, la utilización de precursores como L-KYN (Silva-Adaya *et al.*, 2011), ratones KO para KAT II (Amori *et al.*, 2009), dietas altas en triptófano para ratas (Okuno *et al.*, 2011) inhibidores de la kinurenina-3-hidroxilasa (Erhardt *et al.*, 2011), y todos ellos han demostrado que los niveles de KYNA producen una modificación contraria en los niveles dopaminérgicos cerebrales.

Contrario a lo mencionado, Nilsson y cols., (2006) en un estudio de electrofisiología, observaron que el tratamiento con kinurenina y PROB aumenta la descarga de las neuronas dopaminérgicas del AVT en ratas (Nilsson *et al.*, 2006). Con lo que se podría pensar que la liberación de DA estaría aumentando y esto se opondría a la propuesta de que su modulación es inversa.

La cuestión con todos estos antecedentes es que en todos se modulan los niveles de KYNA, pero no hay ningún estudio en donde se modulen los niveles de DA y con esto poder observar su efecto sobre KYNA y establecer si la relación entre las concentraciones de KYNA y DA es inversa o directa. También sería relevante conocer si el aumento en la descarga de neuronas dopaminérgicas corresponde al aumento significativo en las concentraciones de DA.

11. Conclusión.

En este trabajo se demostró por primera vez que la administración sistémica de PROB exhibe efectos positivos sobre los síntomas del parkinsonismo así como sobre las DIL incluyendo la conducta de giro.

Se observó que el uso de PROB tiene una respuesta más efectiva comparada con el uso de L-DOPA y AMA, los cuales son los fármacos que actualmente son utilizados para el tratamiento de la EP y las DIL.

Debido a que la determinación de KYNA no se correlaciona con la administración de PROB, pero sí se observa un efecto positivo sobre la conducta, podemos asumir que existen otros mecanismos de los ya conocidos, por el cual el fármaco está actuando. Por lo que, es de gran importancia elucidar el mecanismo de acción por el cual el PROB ejerce su efecto para así conocer el o los efectos que está ejerciendo y con ello determinar su utilidad como una estrategia de neuroprotección en la EP, tanto para el tratamiento de la enfermedad así como para la prevención de las DIL.

12. Referencias Bibliográficas.

- Abou-Sleiman, P.M., Healy, D.G., Quinn, N., Lees, A.J., Wood, N.W. (2003). "The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease." *Ann Neurol* 54(3):283-6.
- Abou-Sleiman, P.M., Healy, D.G., Wood, N.W. (2004). "Causes of Parkinson's disease: genetics of DJ-1." *Cell Tissue Res* 318(1):185-188.
- Ahlskog, J.E. & Muenter, M.D. (2001). "Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature." *Mov Disord* 16:448-458.
- Amori, L., Wu, H.-Q., Marinozzi, M., Pellicciari, R., Guidetti, P., & Schwarcz, R. (2009). "Specific inhibition of kynurenate synthesis enhances extracellular dopamine levels in the rodent striatum." *Neuroscience* 159(1):196–203.
- Ascherio, A., Zhang, S.M., Hernán, M.A., Kawachi, I., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Willett, W.C. (2001). "Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women." *Ann Neurol* 50(1):56-63.
- Bacopoulos NG, Heninger GR, Roth RH. (1978) Effects of haloperidol and probenecid on plasma and CSF dopamine metabolites in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Life Sci* ;23(17-18):1805-12.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., & Greenamyre, J. T. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(4), 308–18.
- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., Martignoni, E. (2000). "Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* 62(1):63-88.
- Blandini, F., Armentero, M.T., Martignoni, E. (2008). "The 6-hydroxydopamine model: news from the past." *Parkinsonism & related disorders* 14 Suppl 2, S124–129.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R., & Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65(2), 135–72.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., Braak, E. (2003). "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." *Neurobiology of Aging* 24(2):197–211.
- Brotchie, J. M., Mitchell, I. J., Sambrook, M. A., Crossman, A. R. (1991). "Alleviation of parkinsonism by antagonism of excitatory amino acid transmission in the medial segment of the globus pallidus in rat and primate." *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 6(2):133–138.

- Buck K., Ferger B. (2010). "L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a drug discovery perspective." *Drug Discov Today* 15(19-20):867-875.
- Buracchio T., Arvanitakis Z., Gorbien, M. (2005). "Dementia with Lewy bodies: current concepts." *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 20(5):306–320.
- Calabresi P., Di Filippo M., Ghiglieri V., Tambasco N., Picconi B. (2010) "Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap." *Lancet Neurol* 9(11):1106-1117.
- Campos-Arroyo, D., Martínez-Lazcano, J.C., Melendez-Zajgla, J. (2012) "Probenecid is a chemosensitizer in cancer cell lines." *Cancer Chemother Pharmacol* 69(2):495-504.
- Carlá, V., Lombardi G., Beni M., Russi P., Moneti G., Moroni F. (1988). "Identification and measurement of kynurenic acid in the rat brain and other organs." *Anal Biochem* 169(1):89-94.
- Carrillo-Mora, P., Méndez-Cuesta, L.A., Pérez-De La Cruz, V., Fortoul-van Der Goes, T.I., Santamaría A. (2010). "Protective effect of systemic L-kynurenine and probenecid administration on behavioural and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25-35) in rat hippocampus." *Behav Brain Res* 210(2):240-50.
- Carrillo-Mora, P., Silva-Adaya, D., Villaseñor-Aguayo, K. (2013). Glutamate in Parkinson's disease: Role of antiglutamatergic drugs. *Basal Ganglia*, 3(3):147–157.
- Cenci, M. A., Whishaw, I. Q., & Schallert, T. (2002). Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(7), 574–9.
- Cooper, A.J., Carroll, C.B., Mitchell, I.J. (1998) "Glutamate antagonists for Parkinson's Disease. Rationale for use and therapeutic implications." *CNS Drugs* 9:421-429.
- Crosby, N., Deane, K. H., & Clarke, C. E. (2003). "Amantadine in Parkinson's disease." *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1), CD003468.
- Chen, H.S., Lipton, S.A. (2006) The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* ;97(6):1611-26.
- Diamond, S.G., Markham, C.H., Hoehn, M.M., McDowell, F.H., Muentner, M.D. (1990). "An examination of male-female differences in progression and mortality of Parkinson's disease." *Neurology* 40(5):763-766.
- Dubois, B. & Pillon, B. (1997). "Cognitive deficits in Parkinson's disease." *J Neurol* 244(1):2-8.
- Elghozi, J.L., Mignot, E., Le Quan-Bui K.H. (1983) Probenecid sensitive pathway of elimination of dopamine and serotonin metabolites in CSF of the rat. *J Neural Transm*;57(1-2):85-94.
- Erhardt, S., Oberg, H., Mathé, J.M., Engberg G. (2001). "Pharmacological elevation of endogenous kynurenic acid levels activates nigral dopamine neurons." *Amino Acids* 20(4):353–362.

- Erhardt S, Engberg G. (2002). Increased phasic activity of dopaminergic neurones in the rat ventral tegmental area following pharmacologically elevated levels of endogenous kynurenic acid. *Acta Physiol Scand* 175(1):45-53.
- Fabbrini, G., Brotchie, J.M., Grandas, F., Nomoto M., Goetz, C.G. (2007). "Levodopa-induced dyskinesias." *Mov Disord* 22(10):1379-89.
- Faull, R. L., & Lavery, R. (1969). Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Experimental Neurology*, 23(3), 332–40.
- Foster, A.C., Vezzani, A., French, E.D., Schwarcz, R. (1984). "Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid." *Neurosci Lett* 48(3):273-278.
- Gao, M., Yamazaki, M., Loe, D.W., Westlake, C.J., Grant, C.E., Cole, S.P., Deeley, R.G. (1998). "Multidrug Resistance Protein: Identification of regions required for active transport of Leukotriene C4." *The journal of biological chemistry* 273(17):10733-10740.
- Gil Rubio de la Torre, E. (2009). "Estudio de la fosforilación de parkina y sus implicaciones en la enfermedad de parkinson." Tesis Doctoral. España. Universidad de Granada, Departamento de Anatomía y Embriología humana.
- Gottwald, M.D., Aminoff, M.J. (2011). "Therapies for dopaminergic-induced dyskinesias in Parkinson disease." *Ann Neurol* 69:919-927.
- Graham, W. C., Robertson, R. G., Sambrook, M. A., Crossman, A. R. (1990). "Injection of excitatory amino acid antagonists into the medial pallidal segment of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treated primate reverses motor symptoms of parkinsonism." *Life sciences* 47(18):91–97.
- Grégoire, L., Rassoulpour, A., Guidetti, P., Samadi, P., Bédard, P.J., Izzo, E., Schwarcz, R., Di Paolo, T. (2008). "Prolonged kynurenine 3-hydroxylase inhibition reduces development of levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys." *Behav Brain Res* 186(2):161-167.
- Gubellini, P., Eusebio, A., Oueslati, A., Melon, C., Kerkerian-Le Goff, L., Salin, P. (2006). Chronic high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-DOPA treatment in experimental parkinsonism: effects on motor behaviour and striatal glutamate transmission. *The European Journal of Neuroscience*, 24(6), 1802–14.
- Hardy, J., Lewis, P., Revesz, T., Lees, A., Paisan-Ruiz, C. (2009). "The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review." *Curr Opin Genet Dev* 19(3):254-265.

- Hefti, F., Melamed E., Sahakian B.J., Wurtman R.J. (1980 A) "Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: Effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA". *Pharma Biochem Behav* 12 (2):185-188.
- Hefti, F., Melamed, E., Wurtman R.J. (1980 B) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* 195:123–137
- Hesselink, M.B., Smolders, H., Eilbacher, B., De Boer, A.G., Breimer, D.D., Danysz, W. (1999). "The role of probenecid-sensitive organic acid transport in the pharmacokinetics of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists acting at the glycine(B)-site: microdialysis and maximum electroshock seizures studies." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290(2):543–550.
- Hilmas, C., Pereira, E.F., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., Albuquerque, E.X. (2001). "The brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$ nicotinic receptor expression: physiopathological implications." *J Neurosci* 21:7463–7473.
- Hinson, V.K. (2010). "Parkinson's disease and motor fluctuations." *Curr Treat Options Neurol* 12(3):186-199.
- Jackisch R, Link T, Neufang B, Koch R. (1992). Studies on the mechanism of action of the antiparkinsonian drugs memantine and amantadine: no evidence for direct dopaminomimetic or antimuscarinic properties. *Arch Int Pharmacodyn Ther* ;320:21-42.
- Jankovic, J. (2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(4):368-376.
- Jenner, P. (2003). "Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease." *Curr Opin Neurol* 16 Suppl 1:S3-7.
- Jeon, B. S., Jackson-Lewis, V., Burke, R. E. (1995). 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration: A Journal for Neurodegenerative Disorders, Neuroprotection, and Neuroregeneration*, 4(2), 131–7.
- Kelly, P. H., & Iversen, S. D. (1976). Selective 6OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: Abolition of psychostimulant-induced locomotor activity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 40(1), 45–56.
- Kessler, I.I. (1972). "Epidemiologic studies of Parkinson's disease. II. A hospital-based survey." *Am J Epidemiol* 95(4):308-318.
- Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G., Baudry, M. (1989). "A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic receptors: Characterization and identification of a new class of antagonist." *J Neurochem* 52:1319-1328.

- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." *Nature* 392(6676):605-608.
- Korczyński, A. D. (2003). "Dopaminergic drugs in development for Parkinson's disease." *Advances in Neurology* 91:267–271.
- Lapin, I.P. (1978 B). "Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites." *Pharmacol Res Commun* 10:81-84.
- Lapin, I.P. (1978 A) "Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice." *J Neural Transm* 42:37-43.
- Lekieffre, D., Plotkine, M., Allix, M., Boulu, R.G. (1990). "Kynurenic acid antagonizes hippocampal quinolinic acid neurotoxicity: behavioral and histological evaluation." *Neurosci Lett* 120(1):31-33.
- Lill, C. M., Roehr, J. T., McQueen, M. B., Kavvoura, F. K., Bagade, S., Schjeide, B.M. M., *et al.*, (2012). Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002548.
- Lugo-Huitrón, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muñiz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverri, J., Silva-Adaya, D., Maldonado, P.D., Torres, I., Pinzón, E., Ortiz-Islas, E., López, T., García, E., Pineda, B., Torres-Ramos, M., Santamaría, A., La Cruz, V.P. (2011) "On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress." *Neurotoxicol Teratol* 33(5):538-47.
- Luthman, J., Fredriksson, A., Sundström, E., Jonsson, G., Archer, T. (1989). Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behavioural Brain Research*, 33(3), 267–77.
- Marosi, M., Nagy, D., Farkas, T., Kis, Z., Rózsa, E., Robotka, H., Fülöp, F., Vécsei, L., Toldi, J. 2010 "A novel kynurenic acid analogue: a comparison with kynurenic acid. An in vitro electrophysiological study." *J Neural Transm* 117(2):183-188.
- Michele, L. Rajput, A. H. R., Alexander Rajput (2008). *Epidemiology. Parkinson Disease: diagnosis and clinical management*. S. A. F. W. J. Weiner, Demos Medical Publishing, LLC.
- Miranda, A.F., Boegman, R.J., Beninger, R.J., Jhamandas, K. (1997). "Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid." *Neuroscience* 78:967–975
- Mizoguchi, K., Yokoo, H., Yoshida, M., Tanaka, T., Tanaka, M. (1994). "Amantadine increases the extracellular dopamine levels in the striatum by re-uptake inhibition and by N-methyl-D-aspartate antagonism." *Brain research* 662(1-2):255–258.

- Moroni, F., Russi, P., Lombardi, G., Beni, M., Carlà, V. (1988). "Presence of kynurenic acid in the mammalian brain." *J Neurochem* 51(1):177-180.
- Moroni, F., Russi, P., Gallo-Mezo, M. A., Moneti, G., Pellicciari, R. (1991). "Modulation of quinolinic and kynurenic acid content in the rat brain: effects of endotoxins and nicotinylalanine." *Journal of neurochemistry* 57(5):1630–1635.
- Nilsson, L. K., Linderholm, K. R., Erhardt, S. (2006). "Subchronic treatment with kynurenine and probenecid: effects on prepulse inhibition and firing of midbrain dopamine neurons." *Journal of neural transmission* 113(5):557–571.
- Nutt, J. G. & Wooten, G. F. (2005). Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine* 353(10):1021–1027.
- Okuno, A., Fukuwatari, T., Shibata, K. (2011). "High tryptophan diet reduces extracellular dopamine release via kynurenic acid production in rat striatum." *Journal of neurochemistry* 118(5):796–805.
- Olanow, C.W., Stern, M.B., Sethi, K. (2009). "The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease." *Neurology* 72(21 Suppl 4):S1-136.
- Olson, E.J., Boeve, B.F., Silber, M.H. (2000). "Rapid eye movement sleep behaviour disorder: demographic, clinical and laboratory findings in 93 cases." *Brain*123 (Pt 2): 331-339.
- Ogawa, T., Matson, W. R., Beal, M. F., Myers, R. H., Bird, E. D., Milbury, P., Saso, S. (1992). Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology* 42(9):1702–1706.
- Parsons CG, Danysz W, Quack G, Hartmann S, Lorenz B, Wollenburg C, *et al.* (1997) Novel systemically active antagonists of the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor: electrophysiological, biochemical and behavioral characterization. *J Pharmacol Exp Ther* ;283(3):1264-75.
- Paxinos, G., Watson, C. (2005). "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates" (p. 166). Elsevier Academic Press.
- Perese, D. A., Ulman, J., Viola, J., Ewing, S. E., & Bankiewicz, K. S. (1989). A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Research*, 494(2), 285–93.
- Pérez-De La Cruz, V., Königsberg, M., Santamaría, A. (2007). "Kynurenine pathway and disease: an overview." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(6):398-410.
- Rajput, M. L., Ali H. Rajput, Alexander Rajput (2008). *Epidemiology. Parkinson Disease: diagnosis and clinical management*. S. A. F. W. J. Weiner, Demos Medical Publishing, LLC.
- Robertson, R.G., Farmery, S.M., Sambrook, M.A., Crossman, A.R. (1989). "Dyskinesia in the primate following injection of an excitatory amino acid antagonist into the medial segment of the globus pallidus." *Brain research* 476(2):317–22.

- Sage, J. I. (2008). Fluctuations of Nonmotor Symptoms. *Parkinson Disease: diagnosis and clinical management*. S. A. F. W. J. Weiner, Demos Medical Publishing, LLC.
- Santamaría, A., Ríos, C., Solís-Hernández, F., Ordaz-Moreno, J., González-Reynoso, L., Altagracia, M., & Kravzov, J. (1996). Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology*, 35(1), 23–8.
- Samii, A. (2008). Cardinal Features of Early Parkinson's Disease. *Parkinson Disease: diagnosis and clinical management*. S. A. F. W. J. Weiner, Demos Medical Publishing, LLC.
- Schapira, A. H. (2009). "Etiology and pathogenesis of Parkinson disease." *Neurol Clin* 27(3):583-603.
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 215–24.
- Schwartz, R. K., & Huston, J. P. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in Neurobiology*, 50(2-3), 275–331.
- Sommerauer C, Rebernik P, Reither H, Nanoff C, Pifl C. (2012) The noradrenaline transporter as site of action for the anti-Parkinson drug amantadine. *Neuropharmacology* 62(4):1708-16.
- Szabó, N., Kincses, Z. T., Toldi, J., Vécsei, L. (2011). "Altered tryptophan metabolism in Parkinson's disease: a possible novel therapeutic approach." *Journal of the neurological sciences* 310(1-2):256–60.
- Schwarcz, R. & Pellicciari, R. (2002). "Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities." *J PharmacolExpTher* 303(1):1-10.
- Silva-Adaya, D., Pérez-De La Cruz, V., Villeda-Hernández, J., Carrillo-Mora, P., González-Herrera, I.G., García, E., Colín-Barenque, L., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, A. (2011) "Protective effect of L-kynurenine and probenecid on 6-hydroxydopamine-induced striatal toxicity in rats: implications of modulating kynurenate as a protective strategy." *Neurotoxicol Teratol* 33(2):303-12.
- Silverman, W., Locovei, S., Dahl, G. (2008). "Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels." *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 295(3):C761–767.
- Stone, T. W. (1993). "Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids." *Pharmacol Rev* 45(3):309-379.
- Stone, T. W. (2000). Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(4), 149–54.
- Swartz, K.J., During, M.J., Freese, A., Beal, M.F. (1990). "Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors." *J Neurosci* 10(9):2965-73.

- Tang, C.M., Dichter, M., Morad, M. (1990). "Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H⁺." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(16):6445–6449.
- Tanner, C.M. (2008). *Etiology: The Role of Environment and Genetics. Parkinson Disease: diagnosis and clinical management.* S. A. F. W. J. Weiner, Demos Medical Publishing, LLC.
- Taylor, C. P. & Vartanian, M. G. (1992). Probenecid pretreatment enhances anticonvulsant action of NBQX in mice. *European Journal of Pharmacology*, 213(1):151–153.
- Turski, W.A., Nakamura M., Todd W.P., Carpenter B.K., Whetsell W.O. Jr, Schwarcz R. (1988). "Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue." *Brain Res* 454(1-2):164-169.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, 5(1), 107–10.
- Vamos E., Pardutz A., Klivenyi P., Toldi J., Vecsei L. (2009). "The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection." *J Neurol Sci* 283(1-2):21-27.
- Waters, C. (2008). *Catechol-O-Methyltransferase Inhibitors. Parkinson Disease: diagnosis and clinical management.* S. A. F. W. J. Weiner, Demos Medical Publishing, LLC.
- Weissenborn, R., & Winn, P. (1992). "Regulatory behaviour, exploration and locomotion following NMDA or 6-OHDA lesions in the rat nucleus accumbens." *Behavioural Brain Research*, 51(2):127–137.
- Willis, G. L., & Sandyk, R. (1993). Amphetamine-induced rotational behavior in rats: relationship to hypothalamic and striatal degeneration. *The International Journal of Neuroscience*, 71(1-4), 135–46.
- Wu, H.Q., Baran, H., Ungerstedt, U., Schwarcz, R. (1992). Kynurenic Acid in the Quinolinic-acid-lesioned Rat Hippocampus: Studies In Vitro and In Vivo. *European Journal of Neuroscience*, 4(12):1264–1270.
- Wu, H.Q., Rassoulpour, A., Schwarcz, R. (2006). "Kynurenic acid leads, dopamine follows: a new case of volume transmission in the brain?" *Journal of Neural Transmission* 114(1):33–41.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., *et al.*, (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44(4):601–7.
- Zsizsik, B.K. & Hardeland, R. (2002). "Formation of kynurenic and xanthurenic acids from kynurenine and 3-hydroxykynurenine in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*: role of a novel, oxidative pathway." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133(3):383-92.