



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores
Iztacala

EFFECTO ANTI-DISCINÉTICO Y ANTI-BRADICINÉTICO DE SR141716A Y
CAPSACEPINA EN RATAS LESIONADAS CON 6-OHDA
TRATADAS CON L-DOPA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Ricardo García Ruiz

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Rosa Avila Costa

COMITÉ TUTOR: Dra. Verónica Anaya Martínez
FES Iztacala
Dra. Francisca Pérez Severiano
INNN/FM

Dra. Laura Colín Barenque
FES Iztacala
Dra. Verónica Pérez de la Cruz
INNN/FM
Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid
FES Iztacala



MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2012



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores
Iztacala

EFFECTO ANTI-DISCINÉTICO Y ANTI-BRADICINÉTICO DE SR141716A Y
CAPSACEPINA EN RATAS LESIONADAS CON 6-OHDA
TRATADAS CON L-DOPA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Ricardo García Ruiz

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Rosa Avila Costa

COMITÉ TUTOR: Dra. Verónica Anaya Martínez

FES Iztacala

Dra. Francisca Pérez Severiano

INN/FM

Dra. Laura Colín Barenque

FES Iztacala

Dra. Verónica Pérez de la Cruz

INN/FM

Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid

FES Iztacala



MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de septiembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **GARCÍA RUÍZ RICARDO** con número de cuenta 97109877 con la tesis titulada **"EFECTO ANTI-DISCINÉTICO Y ANTI-BRADICINÉTICO DE SR141716A Y CAPSACEPINA EN RATAS LESIONADAS CON 6-OHDA TRATADAS CON L-DOPA"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MARÍA ROSA ÁVILA COSTA**:

Presidente:	DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ
Vocal:	DRA. FRANCISCA PÉREZ SEGOVIANO
Secretario:	DRA. LAURA COLIN BARENQUE
Suplente:	DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ
Suplente:	DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ -CIRLOS MADRID

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de noviembre 2012.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en ciencias Biológicas de la UNAM.
- Al apoyo de CONACyT, No. Becario 240173, CONACyT-SNI–118320, PAPIIT-DGAPA, UNAM IN220111, PAPCA–Iztacala UNAM- No. 30-2010-2 y No. 30-2010-2011.
- A los miembros del Comité Tutor: Dra. Verónica Anaya Martínez, Dra. Francisca Pérez Severiano, Dra. Laura Colín Barenque, Dra. Verónica Pérez de la Cruz y a la Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a mis padres María Ruiz y Luis García por su total apoyo. A mis hermanos Luis, Graciela, Armando, Mario, Gilberto y Gabriela, siempre tolerantes y a mi lado. A mis sobrinos Fernando, Brenda, Mariana y Mario, siempre un motivo más para seguir adelante con una sonrisa.

A la Dra. María Rosa Avila Costa por su incansable apoyo y por darme la oportunidad de colaborar en el laboratorio de Neuromorfología. A las doctoras Verónica Anaya y Laura Colín, por su apoyo en la realización de este trabajo y guía de mi formación académica.

A mis compañeros del laboratorio de Neuromorfología de quienes siempre recibí apoyo y me tuvieron que soportar: Ana, mi ejemplo de constancia y parte muy importante de la realización de este estudio. A Carmen por su compañía y apoyo incondicional, también parte esencial de este trabajo. A Jesús por su generoso aporte de conocimiento. A Yanelly por su colaboración y por enseñarme tanto. A Alejandra, Javier y Montserrat siempre transmitiendo buen humor. A Paty y Lichita por alentarme a continuar adelante. A Enrique y José Luis por motivarme a conocer más.

A mis amigos por lo que aprendo de ustedes y por compartir conmigo el tiempo a veces tan corto. Ariel, Ivan, Hector Mejía, Hector Molina, Carolina, Vania y Don Victor.

A ti donde sea que estés...

Muchas gracias a todos.

DEDICATORIA

Este trabajo es para la Familia García Ruiz. El dolor de unas ratas, debe de valer el conocimiento obtenido a costa suya. Ese conocimiento debe valer la satisfacción de una familia pero principalmente mostrarnos el funcionamiento del cerebro. Que esa satisfacción guíe el camino para conocer aún más porqué fallamos y cómo evitarlo. Para mi familia este intento por conocernos más.

A pesar de que se limiten los objetos de estudio (en cuanto a enteógenos) por razones ya insostenibles, para aquellas familias, que han pagado con dolor la ignorancia sobre las sustancias que modifican nuestro cerebro. Por la libertad, el debate libre, responsable y objetivo de una realidad mundial, las sustancias psicoactivas pueden ser terapéuticas en determinadas circunstancias.

1. ÍNDICE

1.	ÍNDICE	1
2.	LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	3
3.	LISTA DE ABREVIACIONES	4
4.	RESUMEN	5
5.	ABSTRACT	6
6.	INTRODUCCIÓN	7
	6.1. La Enfermedad de Parkinson.....	7
	6.2. El tratamiento con Levodopa y sus complicaciones.....	7
	6.3. El modelo animal de EP con 6-OHDA y el tratamiento con LD	9
	6.4. El Sistema endocanabinoide y la EP.....	9
	6.5. Los fármacos cannabinoides en la clínica y el laboratorio	12
7.	ANTECEDENTES	14
8.	JUSTIFICACIÓN.....	16
9.	HIPÓTESIS	17
10.	OBJETIVOS	18
	10.1. Objetivo general.....	18
	10.2. Objetivos particulares	18
11.	MATERIAL Y MÉTODOS	19
	11.1. Cirugía estereotáxica y tratamientos.....	19
	11.2. Evaluación de MIA.....	20
	11.3. Video grabación.....	21
	11.4. Preparación del tejido histológico	22
	11.5. Inmunohistoquímica anti-tirosina hidroxilasa (TH)	22
	11.6. Impregnación argéntica por el método de Golgi.....	22

11.7.	Microscopía electrónica de transmisión.....	22
11.8.	Análisis ultraestructural del estriado dorsolateral	23
11.9.	Análisis estadístico	23
12.	RESULTADOS	24
12.1.	Movimientos involuntarios anormales (MIA)	24
12.2.	Manifestación de subtipos de MIA.....	25
12.3.	Inmunocitoquímica anti-TH	26
12.4.	Análisis citológico	29
12.5.	Microscopía electrónica de transmisión.....	31
13.	DISCUSIÓN	34
13.1.	MIA.....	34
13.2.	Alteraciones citológicas.....	39
14.	CONCLUSIONES	43
15.	LITERATURA CITADA	44

2. LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Distribución de los grupos experimentales.....	20
Figura 2. Tipos de MIA evaluados.....	21
Figura 3. Sesiones de evaluación de MIA.....	21
Figura 4. Ultraestructura de la terminal sináptica.....	23
Figura 5. Desarrollo temporal e incidencia de MIA.....	25
Figura 6. Representación de MIA por subtipo.....	26
Figura 7. Conteo de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc.....	27
Figura 8. Cortes coronales representativos del mesencéfalo con neuronas TH positivas de cada grupo.....	28
Figura 9. Número de espinas dendríticas de NEM del estriado dorsolateral.....	29
Figura 10. Cortes representativos con impregnación argéntica de NEM del estriado dorsolateral ipsilateral por el método de Golgi.....	30
Figura 11. Análisis ultraestructural de las terminales sinápticas en el estriado dorsolateral.....	32
Figura 12. Micrografías electrónicas representativas de la ultraestructura es triatal ipsilateral en cada grupo.....	33
Figura 13. Estereotipias en estado “off” en ratas del grupo LD-CSP.....	38

3. LISTA DE ABREVIACIONES

12-HPETE	ácido 12-hidroperoxieicosatetraenóico	LD-RIM	Levodopa-rimonabant
2-AG	2-araquidonil-glicerol	LTD	potenciación de corto plazo
6-OHDA	6-hidroxidopamina	LTP	potenciación de largo plazo
AEA	N-araquidoniletanolamida	MAGL	monoacil glicerol lipasa
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico	MIA	movimiento involuntario anormal
CB1	receptor canabinoide CB1	MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
CB2	receptor canabinoide CB2	NADA	N-araquidonil-dopamina
CTRL	control	NEM	neuronas espinosas medianas
DA	dopamina	NPP	núcleo pedúnculo pontino
DAT	transportador de dopamina	NST	núcleo subtalámico
DIL	discinesias inducidas por Levodopa	po	<i>per os</i> (oral)
eCB	endocannabinoides	sc	subcutánea
EP	enfermedad de Parkinson	SEC	sistema endocanabinoide
FAAH	amida hidrolasa de ácidos grasos	SEM	error estándar de la media
FLAT	transportador de anandamida similar a FAAH	SNc	sustancia <i>nigra</i> compacta
GPe	globo pálido externo	SNr	sustancia <i>nigra</i> reticulada
GPI	globo pálido interno	SR141716A	= rimonabant (antagonista CB1)
ip	intraperitoneal	ST	sin tratamiento
LD	Levodopa	TH	tirosina hidroxilasa
LD-CSP	Levodopa-capsacepina	THC	Δ^9 -tetrahidrocanabinol
		TRPV1	receptor vaniloide de potencial transitorio 1

4. RESUMEN

El tratamiento prolongado con Levodopa (LD) en la enfermedad de Parkinson es tá limitado por el desarrollo de discinecias inducidas por LD (DIL). Sin embargo, estudios recientes han sugerido que la manipulación farmacológica del sistema endocanabinoide puede ser una valiosa herramienta terapéutica para suprimir las DIL. Por lo tanto, por medio de la lesión con 6-OHDA en ratas evaluamos la capacidad de Rimonabant o la capsacepina en combinación con LD respecto a: (1) la severidad de las DIL, midiendo el efecto discinético por el grado de los movimientos involuntarios anormales (MIA); (2) la protección contra la pérdida de células dopaminérgicas y (3) en las diferencias citológicas entre los tratamientos mediante el análisis del número de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas estriatales y la conservación del neuropilo. Nuestros datos demuestran que la coadministración de LD con el antagonista de los receptores CB1 (rimonabant) o con el antagonista TRPV1 (capsacepina) resultan en un tratamiento eficiente que reduce la severidad de los MIA mediante la conservación de algunas células dopaminérgicas funcionales, lo cual implica la mejor conservación de la sinaptología del estriado. Esto es consistente con otros reportes basados en la terapia con antagonistas canabinoides, que no solo pueden ser utilizados para aliviar síntomas motores específicos sino también para retardar/detener la degeneración de las neuronas de la sustancia *nigra* compacta y estriatales.

5. ABSTRACT

The long-term use of Levodopa (LD) for Parkinson disease is limited by the development of L-DOPA-induced dyskinesias (LID). However, recent studies have suggested that pharmacological targeting of the endocannabinoid system may provide a potential valuable therapeutic tool to suppress this LID. Therefore, using the 6-OHDA lesion in rats, we evaluated the ability of rimonabant or capsazepine with the addition of LD in: (1) the severity of LID, the dyskinesic effects were assessed using measures of abnormal involuntary movements (AIM); (2) the protection of dopaminergic cell loss; and (3) in the cytological differences between treatments by means of analyzing the number of dendritic spines of the striatal medium-size spiny neurons and the neuropile preservation. Oral co-administration of each antagonist with LD significantly decreased LIDs. Our data demonstrate that co-administration of LD with CB1 or TRPV1 receptors antagonists result in a very efficient treatment to reduce AIMs through the conservation of some functional dopaminergic cells, which in turn imply the well-preserved synaptology of a less denervated striatum. Thus, consistent with other reports, cannabinoid antagonist-based therapy would not only be aimed at alleviating specific motor symptoms, but also at delaying/arresting the degeneration of striatal and substantia *nigra* compacta neurons.

6. INTRODUCCIÓN

6.1. La Enfermedad de Parkinson

A nivel mundial la esperanza de vida humana ha aumentado desde hace varios años, epidemiológicamente esto implica el aumento en la incidencia de enfermedades cuyo principal factor de riesgo es la edad avanzada como en la enfermedad de Parkinson (EP) (Mathers y Loncar, 2006; Collier *et al.*, 2011). Se estima que para el año 2030 haya 9.3 millones de pacientes con EP tan solo en los 15 países más poblados del mundo (Dorsey *et al.*, 2007). La EP es un padecimiento crónico neurodegenerativo de etiología aún desconocida que afecta varias estructuras cerebrales antes de la manifestación clínica de sus síntomas motores principales, el temblor en reposo, rigidez, bradicinesia y acinesia (Halliday *et al.*, 2011), evidentes cuando al menos 50% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* compacta (SNc) se han perdido (Lang, 2007; Ferrer *et al.*, 2011; Gaenslen *et al.*, 2011), produciendo la disminución de casi el 80% de dopamina (DA) en el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), el principal sitio de proyección de esta vía nigroestriatal (Scherfler *et al.*, 2007). La integridad de esta población de neuronas mesencefálicas determina la evolución de los síntomas, por lo cual su pérdida es la principal característica histopatológica de la enfermedad (Damier *et al.*, 1999).

6.2. El tratamiento con Levodopa y sus complicaciones

Por 50 años, el reemplazo farmacológico de DA por la administración de su precursor metabólico Levodopa (LD) ha sido el tratamiento principal contra los síntomas motores por su alta y pronta eficacia (Smith *et al.*, 2012), además de que mejora la calidad de vida y reduce la tasa de mortalidad de los pacientes respecto a los no tratados (Pearce, 1978; Fahn *et al.*, 2004). Desafortunadamente en la mayoría de los pacientes la progresión de la neurodegeneración y el tiempo de tratamiento son factores que limitan el uso terapéutico de la LD, por lo que su administración por más de 4 a 6 años produce en el 40% de los pacientes, marcados efectos adversos como discinesias y fluctuaciones motoras. Esta proporción aumenta a más del 80% después de entre 8 y 15 años de tratamiento (Ahlskog y Muenter, 2001). Las discinesias inducidas por Levodopa (DIL) son una complicación motora con efecto negativo en la calidad de vida física, social y económica del paciente (Dodel *et al.*, 2001) que afectan los músculos faciales, la mandíbula, lengua, cuello, brazos, pies y tronco corporal, consistiendo en la combinación de distonía, corea y atetosis (Mones *et al.*, 1971). Las DIL comúnmente se presentan como distonía y corea, correspondiendo con la concentración más alta de LD en el cerebro por lo que se conocen

como de “pico de dosis”. Con menor frecuencia se manifiestan cuando se tiene menor concentración de DA en el cerebro, como ocurre durante las transiciones entre el mayor efecto anti-parkinsoniano de la LD (estado “on”) y al disminuir éste (estado “off”) produciendo “discinesias difásicas”. La “disonía off” se presenta cuando la concentración de DA es muy baja, como es común al inicio del día cuando aún no se toma la primera dosis de LD (Calabresi *et al.*, 2010).

La degeneración de la vía nigroestriatal, el tratamiento con LD y la edad de inicio de la sintomatología parkinsoniana, son factores fundamentales para la manifestación de DIL. La topografía estriatal de la denervación dopaminérgica, las dosis de LD usadas, el tiempo de tratamiento y la regularidad de su uso son condiciones que determinan la intensidad y tipo de las DIL (Calabresi *et al.*, 2010). El tratamiento farmacológico con LD genera concentraciones de DA muy variables en el cerebro produciendo la estimulación pulsátil de los receptores postsinápticos estriatales de DA. Los procesos fisiológicos para compensar la deficiencia de DA involucran alteraciones en el metabolismo, la expresión génica, angiogénesis estriatal y modificaciones de plasticidad sináptica aberrante, por lo cual se considera que las DIL son una forma de aprendizaje motor patológico, permanente (Linazasoro *et al.*, 2004; Lindgren *et al.*, 2009). Por otro lado, la bradicinesia es un síntoma cardinal de la EP reversible con LD en las etapas tempranas de la enfermedad, sin embargo con el tiempo de tratamiento y la progresión de la enfermedad se acentúa, volviéndose intratable con LD (Fahn, 2006). Esencialmente se caracteriza por la lentitud en la ejecución del movimiento y suele usarse como sinónimo de acinesia (pobreza de movimientos espontáneos, el “congelamiento” motor, dificultad para iniciar el movimiento) e hipocinesia (la disminución de la amplitud del movimiento) predominantes en etapas avanzadas de la EP (Berardelli *et al.*, 2001). La manifestación de bradicinesia y DIL en la EP avanzada es consecuencia de la respuesta anómala al tratamiento con LD, volviéndose progresivamente debilitantes e incapacitantes (Pahwa *et al.*, 2006; Coelho y Ferreira, 2012). En edad temprana, estos síntomas pueden ser tratables con cirugía, pero en pacientes mayores, las probabilidades de éxito se reducen. La cirugía ablativa o la estimulación cerebral profunda de estructuras del circuito motor extrapiramidal producen alivio de estos síntomas, sin embargo parece ser que sus mecanismos desencadenantes operan de forma opuesta ya que la atenuación de un síntoma empeora el otro, además de que pueden presentarse simultáneamente con distinta intensidad (Ghassemi *et al.*, 2006; Obeso *et al.*, 2008).

6.3. El modelo animal de EP con 6-OHDA y el tratamiento con LD

Varias de las alteraciones motoras inducidas por la pérdida de dopamina estriatal en la EP son reproducibles en ratas (Schwartz y Huston, 1996), incluyendo las producidas por el tratamiento con LD (Lundblad *et al.*, 2002). Los fármacos dopaminérgicos y no dopaminérgicos que disminuyen las discinesias en el humano, también pueden disminuir las DIL en el modelo animal de EP inducido con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas (Schallert y Norton, 1992; Cenci *et al.*, 2002; Lundblad *et al.*, 2002). Este modelo consiste en la lesión estereotáxica unilateral de la vía nigroestriatal, mediante la inyección de la neurotoxina selectiva 6-OHDA (usualmente 8 µg, independientemente del peso de la rata), en el conjunto de axones de las neuronas de la SNc que proyectan hacia el cuerpo estriado y que conforman el haz medial del cerebro anterior (Ungerstedt, 1971). La degeneración asimétrica de la vía nigroestriatal también ocurre en la EP (Kempster *et al.*, 1989), y en ambos casos la consecuencia funcional es el hemiparkinsonismo, que afecta principalmente el lado corporal contralateral al hemisferio más degenerado, con signos como rigidez, bradicinesia, alteraciones posturales y de la marcha (Schallert y Norton, 1992; Schwartz y Huston, 1996). Las ratas lesionadas en este modelo que reciben tratamiento con LD manifiestan gradualmente movimientos involuntarios anormales (MIA) que afectan la zona craneofacial, las extremidades y el tronco corporal (Winkler *et al.*, 2002; Spinnewyn *et al.*, 2011). Estas DIL en ratas responden a la fenomenología de “pico de dosis” cuando se administra una dosis fija, diaria de LD (hasta 600 mg) (Nutt, 1990; Fahn, 2000).

6.4. El Sistema endocanabinoide y la EP

La progresión de la enfermedad y el prolongado tratamiento con LD alteran distintos sistemas fisiológicos resultando en la manifestación de las DIL y otras complicaciones motoras no tratables con LD, lo que obliga a buscar otras alternativas al reemplazo farmacológico de DA (Iravani y Jenner, 2011). El sistema endocanabinoide (SEC) es un sistema de señalización ampliamente distribuido en el sistema nervioso central con gran impacto fisiológico (Kano *et al.*, 2009). Su influencia en el control del circuito motor extrapiramidal y en la supervivencia neuronal es crucial para el desarrollo de terapias para enfermedades neurodegenerativas como la EP (Giuffrida y McMahon, 2010; Fernández-Ruiz *et al.*, 2011) y sus complicaciones producidas por el tratamiento con LD (Calabresi *et al.*, 2010; Iravani y Jenner, 2011). El principal núcleo de entrada del circuito es el cuerpo estriado, que integra la información de las proyecciones neuronales estriatonigrales (de la

vía directa), estriatopalidales (de la vía indirecta), corticoestriatales (Chevalleyre *et al.*, 2006), tálamoestriatales, pálidoestriatales e interneuronas estriatales GABAérgicas y colinérgicas (Fusco *et al.*, 2004). Todas bajo el control de endocannabinoides (eCB) desde la pre y/o postsinapsis regulando varios procesos de plasticidad sináptica de corto y largo plazo (Di Filippo *et al.*, 2008; Kano *et al.*, 2009; Di Marzo, 2011). Además están bajo control tónico de la DA desde la SNc (Rommelfanger y Wichmann, 2010) que proyecta sus eferencias al núcleo subtalámico (NST), el tálamo, el GP externo e interno (GPe y GPi respectivamente), la SNr y recibe aferencias de la corteza, el NST y en núcleo pedúnculo pontino (NPP), estructuras cuya función también está bajo el control de los eCB y la DA (François *et al.*, 2000; Jan *et al.*, 2000; Misgeld, 2004; Anaya-Martínez *et al.*, 2006; Kano *et al.*, 2009; Rice *et al.*, 2011).

El SEC es un sistema de señalización que comprende una familia de moléculas lipídicas, (los eCB), sus enzimas de síntesis, transporte y degradación, sus receptores, de los que se han descrito los metabotrópicos (tipo CB1 y CB2) e ionotrópicos (TRPV), además de otras proteínas relacionadas, como los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) distintos de receptores CB1 y CB2, y proteínas de interacción con el receptor CB1 (CRIP1) (Giuffrida y McMahon, 2010; Howlett *et al.*, 2010; Di Marzo, 2011). Los eCB mejor caracterizados son la N-araquidoniletanolamida (AEA) o anandamida (Devane *et al.*, 1992) y el 2-araquidonil-glicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995). El receptor CB1 es la proteína acoplada a proteína G más abundante en el sistema nervioso central (Howlett *et al.*, 2004) y el principal sitio de unión del Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) (Devane *et al.*, 1988), el compuesto psicoactivo de la planta *Cannabis sativa*, de cuyo nombre se deriva el del sistema endocanabinoide (Gaoni y Mechoulam, 1964). El efecto motor del THC y de varios agonistas endógenos del receptor CB1 como la AEA o sintéticos como el CP55940 es predominantemente de inhibición motora (Fernández-Ruiz y González, 2005). En zonas de control motor como la corteza, los ganglios basales y el cerebelo, el receptor CB1 se expresa en abundancia (Mailleux y Veyerhaeghen, 1992a, b).

En la EP se han descrito alteraciones importantes en la actividad del SEC. En la etapa presintomática, hay disminución de la expresión del receptor CB1 en el núcleo caudado (Ferrer *et al.*, 2011). En las primeras etapas sintomáticas, la expresión del receptor disminuye en la sustancia nigra reticulada (SNr) y aumenta en el hipocampo, la corteza cingulada medial, la corteza prefrontal, la ínsula anterior y en el putamen, principalmente

en el lado contralateral al más afectado por el parkinsonismo en pacientes con o sin DIL (Van Laere *et al.*, 2012). En etapas avanzadas, la expresión del receptor CB1 en el cuerpo estriado aumenta (Lastres-Becker *et al.*, 2001) lo cual es consistente con el aumento de AEA en el líquido cerebroespinal de pacientes con EP y su estado predominante de hipocinesia (Fernández-Ruiz y Gonzáles, 2005; Pisani *et al.*, 2010). Este aumento de AEA es reversible con el tratamiento con LD, revelando que el SEC puede modificarse homeostáticamente en estados patológicos (Pisani *et al.*, 2011). La AEA y el 2-AG, son los principales ligandos endógenos del receptor CB1 (Devane *et al.*, 1992; Sugiura y Waku, 2000). Se sintetizan en altas concentraciones en los ganglios basales por enzimas de síntesis localizadas en membranas intracelulares de la postsinapsis donde los eCB son liberados retrógradamente a la presinapsis, donde los receptores CB1 se distribuyen predominantemente en las terminales axónicas produciendo generalmente, la inhibición de la liberación de neurotransmisores (Devane *et al.*, 1992; Sugiura *et al.*, 1995; Chevaleyre *et al.*, 2006; Di Marzo, 2011). La recaptura de AEA y de 2-AG a través de un transportador membranal expresado en neuronas y astrocitos (Beltramo y Piomelli, 2000; Fu *et al.*, 2012) y su posterior degradación por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH-1) en el caso de AEA (Cravatt *et al.*, 2001) y monoacil glicerol lipasa (MAGL) para 2-AG, determinan la intensidad y duración de la señalización producida por la activación del receptor CB1 (Nomura *et al.*, 2008).

Por otro lado, los eCB pueden activar varios receptores vaniloides-cannabinoides como el receptor vaniloide de potencial transitorio 1 (TRPV1), un canal ionotrópico canabinoide que genera influjo catiónico al activarse (Patapoutian *et al.*, 2009). Se activa con ligandos endógenos relacionados con el ácido araquidónico como la AEA (Zygmunt *et al.*, 1999), N-araquidonil-dopamina (NADA) (Huang *et al.*, 2002), el ácido 12-hidroperoxieicosatetraenóico (12-HPETE) y el eucotrieno B₄, abundantes en el cuerpo estriado, la SNc o en ambos (Shin *et al.*, 2002). Compuestos exógenos orgánicos como la capsaicina, o la resiniferatoxina, así como por protones, calor o la presión mecánica también pueden activarlo (Smart *et al.*, 2000; Caterina y Julius, 2001). Los receptores TRPV1 se expresan en la corteza, el estriado, el GP, el tálamo, el cerebelo y en la SNc (Mezey *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 2005; Cristino *et al.*, 2006). La capsaicina administrada sistémicamente disminuye la concentración de DA en el estriado (Hajos *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 2006) en un proceso regulado por la activación del receptor TRPV1 en la SNc como ocurre con la AEA (de Lago *et al.*, 2004; Tzavara *et al.*, 2006) y que funcionalmente

reduce la actividad motora (Di Marzo *et al.*, 2001a; Lastres-Becker *et al.*, 2003). En condiciones de hipodopaminergia por inactivación del transportador de DA (DAT) se induce hiperactividad sensible a la activación de TRPV1 por AEA en el estriado, donde aumenta la expresión del receptor TRPV1 y disminuye la concentración de AEA (Tzavara *et al.*, 2006).

Existe evidencia de la colocalización de receptores TRPV1 y CB1 en el estriado, en el núcleo entopeduncular (NE, el análogo al GPi de primates en ratas), en el GPe y en la SNc embrionaria. Cuando se colocan en una misma neurona, la activación del receptor CB1 o TRPV1 produce efectos opuestos entre sí sobre la concentración de calcio intracelular, dependiendo del estado de activación concomitante de la vía de señalización dependiente de AMPc, lo cual puede modificar el estado de sensibilización/desensibilización del receptor TRPV1 (Koplas *et al.*, 1997; Mohapatra y Nau, 2005; Patwardhan *et al.*, 2006). La AEA extracelular es más afín por CB1 a bajas concentraciones y por TRPV1 a altas concentraciones (De Petrocellis *et al.*, 2001b; Hermann *et al.*, 2003). Esta diferencia de afinidad está determinada por la localización del sitio de unión del ligando al receptor TRPV1 en el citosol y predominantemente extracelular de CB1 (Jung *et al.*, 1999; Pertwee, 1999; De Petrocellis *et al.*, 2001a; Jordt y Julius, 2002). De esta forma la actividad del transportador de AEA similar a FAAH (FLAT, por sus siglas en inglés) y sus inhibidores pueden influir en el efecto y grado de la activación de los receptores TRPV1 (De Petrocellis *et al.*, 2000). En la SNc la AEA proveniente de terminales GABAérgicas de la SNr o estriatales, puede activar receptores TRPV1 en aferencias glutamatérgicas facilitando la actividad tónica de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Marinelli *et al.*, 2003; Musella *et al.*, 2009). En general, el efecto fisiológico de la activación de CB1 o TRPV1 es sinérgico y sensible a antagonistas de ambos receptores (Cristino *et al.*, 2006), pues la activación de CB1 puede indirectamente favorecer la activación de TRPV1 (Hermann *et al.*, 2003) y la activación de TRPV1 favorecer la activación de CB1 (Di Marzo *et al.*, 1998; Di Marzo *et al.*, 2001b). Esta relación es importante pues la activación de CB1 es funcionalmente opuesta a la activación del TRPV1 en la manifestación de DIL (Morgese *et al.*, 2007).

6.5. Los fármacos cannabinoides en la clínica y el laboratorio

Varias culturas antiguas describían el conocimiento empírico de las propiedades de la *Cannabis sp* como “relajante muscular”. A finales del siglo XIX el neurólogo William

Gowers la prescribía para tratar temporalmente el temblor en reposo (Russo, 2007; Goetz, 2011). Sin embargo en la actualidad estas propiedades no es tan consistentemente confirmadas, aunque se sugiere la posibilidad de que pacientes con EP con episodios de temblor desencadenado por estados de ansiedad, puedan atenuar el temblor al fumar *Cannabis* (Frankel *et al.*, 1990). El consumo crónico de *Cannabis* en pacientes con EP puede disminuir la bradicinesia, la rigidez y las discinesias (Venderova *et al.*, 2004). Estudios en pacientes con EP que tomaron extractos de *Cannabis* reportan mejora significativa en ciertas capacidades cognitivas (Carroll *et al.*, 2004), además de que el canabidiol (un compuesto no psicoactivo de la *Cannabis*), posee efecto anti-psicótico en pacientes con EP (Zuardi *et al.*, 2009). Se ha reportado también que el canabidiol puede ser anti-discinético en animales (Conti *et al.*, 1987). La Nabilona, un agonista sintético del receptor CB1, puede disminuir el tiempo de manifestación de DIL en humanos (Sieradzan *et al.*, 2001). Distintos agonistas del receptor CB1 han mostrado poseer este efecto atenuante de las DIL en estudios realizados en diferentes modelos animales de EP inducidos en primates (Fox *et al.*, 2002) y roedores (Ferrer *et al.*, 2003; Gilgun-Sherki *et al.*, 2003; Segovia *et al.*, 2003; Morgese *et al.*, 2007).

A la fecha no está reportada la disminución de las DIL en pacientes con EP por la administración de antagonistas de receptores canabinoides (Mesnage *et al.*, 2004), sin embargo, en diferentes modelos experimentales de EP en primates (Brotchie *et al.*, 1998; van der Selt *et al.*, 2005) y roedores (Ferrer *et al.*, 2003), la administración de antagonistas del receptor CB1 sí ha mostrado atenuar las DIL. En estas especies se ha reportado que la administración de antagonistas del receptor CB1 aumenta el tiempo del efecto terapéutico (estado “on”) de la LD (Cao *et al.*, 2007; Kelsey *et al.*, 2009) y bajo ciertas circunstancias, puede inducir efecto neuroprotector (Hansen *et al.*, 2002; Pegorini *et al.*, 2006). No hay reportes en humanos sobre el uso de agonistas o antagonistas del receptor TRPV1 en la EP, y en animales comienza a conocerse su influencia en el movimiento y su interacción con eCB y DA en modelos animales de EP, como lo observado en ratas reserpinizadas tratadas con LD cuya hipomotilidad inducida con capsaicina fue revertida por la administración sistémica de capsacepina (Lee *et al.*, 2006). En general, las notables discrepancias en cuanto a la utilidad terapéutica de estos tratamientos antagonistas o agonistas sugieren que el SEC es un sistema cuya actividad depende en gran parte del grado de preservación de la vía nigroestriatal y el tipo y duración de los tratamientos en coadministración con LD (García-Arencibia *et al.*, 2009).

7. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se han descrito ampliamente las alteraciones citológicas causadas por la eliminación unilateral de la vía nigroestriatal con 6-OHDA (Avila-Costa *et al.*, 2005b; Avila-Costa *et al.*, 2008), un modelo utilizado también para el estudio de los efectos adversos de la administración de LD. Trabajos como el de Walsh y colaboradores muestran que las ratas lesionadas con 6-OHDA, tratadas primero crónicamente con LD (10 mg/kg más 16 mg/kg sc de benserazida por seis semanas) y luego subcrónicamente (dos dosis semanales durante tres semanas) desarrollan DIL bifásicas. La administración aleatoria cruzada del agonista CB1, HU210 en dosis semanales de 0.5, 5 y 50 µg/kg ip durante el tratamiento subcrónico con LD, disminuyó la severidad de las DIL bifásicas, pero también indujo catalepsia y acinesia. La administración del antagonista CB1, AM251 (3 mg/kg ip, una dosis semanal) durante el tratamiento subcrónico con LD, no indujo efecto significativo en la actividad motora. Las ratas lesionadas que no presentaron DIL durante el tratamiento crónico con LD fueron tratadas con SR141716A (antagonista CB1) también conocido por su nombre genérico rimonabant (3 mg/kg ip) por 18 días y observaron que manifestaron DIL no expresadas previamente (Walsh *et al.*, 2010a).

Tadaiesky y colaboradores en 2010 probaron el efecto de la administración aguda de rimonabant (3 mg/kg ip) en ratas moderadamente lesionadas por la inyección intraestriatal de 6-OHDA; observaron que en la prueba de nado forzado, el rimonabant disminuye el tiempo de inactividad y reduce el tiempo de reconocimiento social en tres ratas. Estas pruebas son indicadores de su efecto anti-depresivo y de mejoramiento cognitivo, respectivamente (Tadaiesky *et al.*, 2010). Kelsey y colaboradores probaron que la administración de rimonabant en dosis entre 0.05 y 1 mg/kg induce mejora en la ejecución motora del miembro superior contralateral a la lesión y que el rimonabant (0.05 mg/kg ip), inmediatamente seguido de LD-metil éster (8 mg/kg más 6 mg/kg de benserazida ip) puede aumentar este beneficio motor antiparkinsoniano inducido por la LD, por lo tanto estos autores demostraron que el rimonabant a dosis bajas tiene efecto anti-bradikinético por sí mismo y que puede potenciar el efecto de la LD (Kelsey *et al.*, 2009).

Fernández-Espejo y colaboradores probaron el efecto anti-parkinsoniano y neuroprotector del rimonabant a varias dosis (0.1, 0.5 y 1 mg/kg ip) en un estudio farmacológico cruzado tipo "latin square", mostrando que la administración sistémica de rimonabant puede tener

efecto anti-parkinsoniano en ratas severamente lesionadas con pérdida de más del 95% de neuronas dopaminérgicas de la SNc, disminuyendo la asimetría motora, la acinesia, mejorando la orientación sensorimotora y la ejecución de miembro contralateral en forma dosis dependiente. Al inyectar rimonabant directamente en el GP o en el estriado notaron que reducía el giro inducido por anfetamina pero no al inyectarse en la SNc. En el estriado, esta conducta se relaciona de forma opuesta a la producida por agonistas específicos D1 o D2 a la del giro inducido por anfetamina, de forma que la infusión intraestriatal de rimonabant potencia el efecto funcional de la activación del receptor D1 y antagoniza el de la activación del D2 (Fernandez-Espejo *et al.*, 2005).

Respecto a la utilidad de la capsacepina en el modelo con 6-OHDA solo existe un antecedente directo, el trabajo de Morgese y colaboradores, en el que probaron el efecto atenuante de DIL difásicas inducidas con LD (6 mg/kg ip mas 12 mg/kg ip de carbidopa) del agonista CB1, WIN55212-2 (0.5 – 1 mg/kg ip), sin inducir catalepsia. A su vez la coadministración del inhibidor de la enzima FAAH, URB597 (0.3 mg/kg ip) y el antagonista TRPV1, capsacepina (10 mg/kg ip) 15 minutos antes de la dosis correspondiente de LD, también redujo significativamente las DIL bifásicas. En esta condición el rimonabant (1 mg/kg ip) disminuyó parcialmente la severidad del MIA orofacial al ser administrado 15 minutos antes de la administración de la combinación de URB597 y capsacepina. Este estudio sugiere que la activación del receptor CB1 puede ser eficaz en la disminución de DIL difásicas y que la activación del receptor TRPV1 tiene un efecto opuesto sobre la manifestación de DIL (Morgese *et al.*, 2007). El otro estudio corresponde a otro modelo de EP, el de reserpina; Lee y colaboradores en 2006, probaron que ratas reserpinizadas tratadas con LD (125 mg/kg ip) y capsaicina (1mg/kg ip) reducen su actividad locomotora respecto a las tratadas solo con LD y que este efecto es reversible si además se administra el antagonista capsacepina (10 mg/kg ip) (Lee *et al.*, 2006).

8. JUSTIFICACIÓN

La bradicinesia y las DIL son alteraciones motoras altamente incapacitantes en la EP avanzada cuando la LD pierde eficacia anti-parkinsoniana e induce complicaciones motoras. El SEC es un sistema de señalización sobre activado en estados avanzados de ésta enfermedad, el antagonismo de los receptores cannabinoides CB1 o TRPV1 han mostrado efectos positivos en la disminución de las alteraciones motoras inducidas por la LD en estudios con modelos animales de la EP y la conservación citológica en estudios *in vitro*. Por tal motivo, se realizó un estudio con el modelo animal de la EP con 6-OHDA en ratas tratadas oralmente con LD y rimonabant (antagonista CB1) o LD y capsacepina (antagonista TRPV1) para determinar el efecto de estos tratamientos sobre la conducta motora, la citología y la ultraestructura de la vía nigroestriatal y compararlo con el efecto del tratamiento único con LD y con ratas lesionadas sin tratamiento.

9. HIPÓTESIS

El tratamiento prolongado con LD produce alteraciones motoras y citológicas en el cuerpo estriado y la SNc. Los receptores CB1 y TRPV1 se expresan en abundancia en la vía nigroestriatal donde regulan la transmisión sináptica, la supervivencia celular e influyen en el control del movimiento, por lo que la administración de LD y rimonabant o LD y capsacepina puede favorecer la supervivencia celular en la SNc y la conservación de las espinas dendríticas de las NEM del cuerpo estriado dorsolateral así como la conservación de su ultraestructura, prolongando el tiempo de efectividad anti-parkinsoniana del tratamiento crónico con LD y atenuando las alteraciones motoras no deseadas en ratas lesionadas con 6-OHDA.

10. OBJETIVOS

10.1. Objetivo general

Comparar el efecto del tratamiento crónico con LD sola y en coadministración con el antagonista del receptor CB1 (rimonabant), o en coadministración con el antagonista TRPV1 (capsacepina), sobre las DIL, la bradicinesia, y la conservación citológica del cuerpo estriado y la sustancia *nigra* compacta de ratas lesionadas con 6-OHDA.

10.2. Objetivos particulares

- Evaluar la severidad de los movimientos involuntarios anormales (MIA) inducidos por L-Dopa.
- Comparar el número de neuronas dopaminérgicas en la SNc ipsi y contralateral a la lesión en ratas con y sin tratamiento.
- Comparar el número de espinas dendríticas en neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado ipsi y contralateral de los grupos con y sin tratamiento.
- Comparar las alteraciones ultraestructurales en el cuerpo estriado ipsi y contralateral a la lesión de todos los grupos.

11. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar con peso corporal de 180 a 200g al inicio del estudio. Fueron mantenidas en cajas de acrílico transparentes en condiciones controladas de temperatura e iluminación y con libre acceso a agua y alimento (Teklad Global, Harlan, EUA). Diariamente se registró el peso de cada rata. El protocolo experimental se llevó a cabo de acuerdo al “Animal Act” para experimentación científica de 1986 y en todo momento se trató de minimizar el número de animales empleado y su sufrimiento durante la cirugía, la administración de los tratamientos y la realización de las pruebas conductuales.

11.1. Cirugía estereotáxica y tratamientos

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (35 mg/kg ip) y colocadas en un aparato estereotáxico (Kopf Instruments, EUA) para la lesión. Se les inyectó 4 µl de solución salina al 0.9%, que contenían 0.2 mg de ácido ascórbico, para evitar la autooxidación de la toxina, (Grupo I, control o CTRL, n=6) y 8 µg de 6-OHDA (Sigma Chemical, EUA, para los demás grupos) en el haz medial del cerebro anterior del hemisferio izquierdo con las coordenadas: AP=6.1 mm respecto a la línea interaural, L=1.6 mm respecto a bregma y V=8.1 mm respecto a la duramadre (Paxinos y Watson, 2007). La inyección se realizó con una microjeringa Hamilton acoplada a una micropipeta de vidrio de 20-50 µm de diámetro. Se inyectó la solución lentamente por cinco minutos y se esperó por dos minutos para mejor difusión de la toxina antes de retirar la jeringa lentamente. Después de la recuperación de la anestesia, las ratas se regresaron a sus cajas. Cuarenta y ocho horas después de la lesión se administró apomorfina (0.25 mg/kg ip, Sigma Chemical, EUA) para inducir giro contralateral a la lesión y seleccionar para este estudio a los animales que giraron más de 200 veces en 30 minutos (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). Esto nos permitió seleccionar solo ratas con más de 90% de pérdida de DA estriatal y de más del 90% de pérdida de neuronas dopaminérgicas TH positivas en la SNc (Hudson *et al.*, 1993; Lindner *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2001). Veinticuatro horas después de la prueba de giro se seleccionaron 24 ratas y se dividieron en 4 grupos de 6 organismos cada uno (Figura 1). El grupo II (ST) se mantuvo sin tratamiento; el grupo III (LD) fue tratado con una dosis diaria por vía oral de Levodopa (30 mg/kg de Carbidopa/LD 25/250, 1:10; Sinemet, Merk Sharp & Dohme). El grupo IV (LD-RIM) recibió la misma dosis de LD junto con el antagonista del receptor CB1, SR141716A (rimonabant, 1 mg/kg po,

Cayman chemicals, EUA). El grupo V (LD-CSP) recibió la misma dosis de LD junto al antagonista del receptor TRPV1, capsacepina (1 mg/kg po, Cayman chemicals, EUA). En todos los casos, el comprimido de Sinemet era molido en un mortero y disuelto en 10 ml de agua potable. La dosis y vía de administración de LD en este estudio fue suficiente para tener un efecto anti-parkinsoniano pero a la vez para inducir DIL consistentes (Lindner *et al.*, 1996; Padovan-Neto *et al.*, 2009). Cuando la LD se coadministró con algún antagonista, la dosis correspondiente de ambos fármacos se mezcló y se aplicó en el hocico con una jeringa de 1ml sin aguja. Todos los grupos se mantuvieron por 58 días.

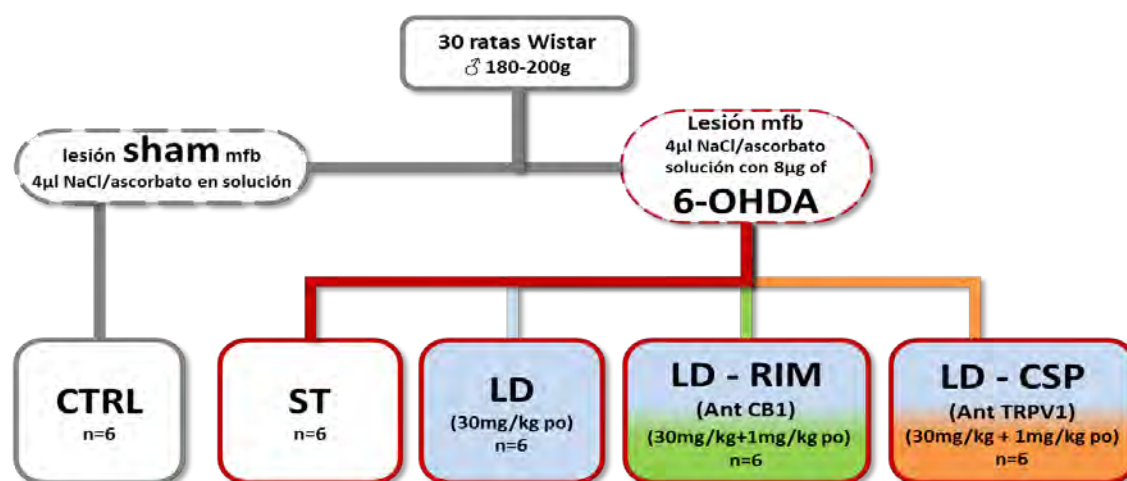


Figura 1. Distribución de los grupos experimentales. Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar distribuidos como: Grupo lesión falsa (CTRL), y cuatro grupos lesionados con 6-OHDA (recuadros rojos) de los cuales, uno se mantuvo sin tratamiento (ST), y los otros tres recibieron una dosis diaria de Levodopa (azul) sola (LD) o en coadministración con rimonabant (LD-RIM) o con capsacepina (LD-CSP), todos por vía oral durante 58 días.

11.2. Evaluación de MIA

Se evaluó la severidad de los MIA inducidos por la LD de acuerdo a la escala de Cenci (Cenci y Lundblad, 2007). Cada rata se colocó en una caja de acrílico transparente y fue video grabada por un minuto cada 20 minutos, a partir de 20 minutos antes de la medicación hasta 180 minutos después de ésta (10 observaciones en total por sesión por rata). Se registraron 4 subtipos de MIA de acuerdo a su distribución topográfica como: orolinguales, axiales, del miembro superior y locomotores (Figura 2). La citada escala, asigna el grado de severidad de cada MIA manifestado durante un minuto de observación. Así el valor de severidad 0 corresponde al que no se manifestó durante ese minuto; el valor 1, al que se presentó por menos del 50% del tiempo de observación es decir menos de 30 segundos; el valor 2, corresponde a las alteraciones presentadas por más del 50% pero no todo el tiempo; el valor 3 a las manifestadas todo el tiempo pero interrumpibles por algún estímulo externo como sonido, o ligeros golpes en la caja; el máximo valor, 4,

corresponde a los MIA más severos realizados todo el tiempo sin ser interrumpidos por estímulos externos. En el caso de movimientos con severidad intermedia la escala permite la asignación de valores fraccionarios como 0.5 ó 3.5 a para mayor sensibilidad y precisión.



Figura 2. Tipos de MIA evaluados. Los movimientos orolinguales consisten en la protrusión de la lengua hacia el lado contralateral a la lesión y movimientos masticatorios repetitivos. Los axiales en la torsión de los músculos axiales ocasionando postura distónica contralateral a la lesión que cuando se presenta con gran severidad puede hacer perder el balance y la caída de la rata. Los del miembro contralateral a la lesión, son movimientos cortos, repetitivos y de gran frecuencia hacia arriba y hacia abajo generalmente hacia el hocico o en círculos de poca amplitud con posturas distónicas de lodo y la muñeca, y rigidez en el hombro. Los locomotores son movimientos continuos, giratorios de 360° en dirección contralateral a la lesión, ejecutados con al menos 3 extremidades en contacto con la superficie. Modificado de Winkler *et al.*, 2002.

11.3. Video grabación

Cada 14 días (cuatro evaluaciones en total. Figura 3) se realizó el monitoreo en video para la evaluación de la severidad de los MIA para lo cual se usó una cámara Panasonic (SRD-H80). Todas las evaluaciones fueron grabadas y algunas escenas representativas fueron capturadas con el software de edición de video Final Cut Pro. Las fotos así obtenidas fueron recortadas y ajustadas solo en color y brillo con el software Adobe Photoshop y no se realizó ninguna otra alteración.

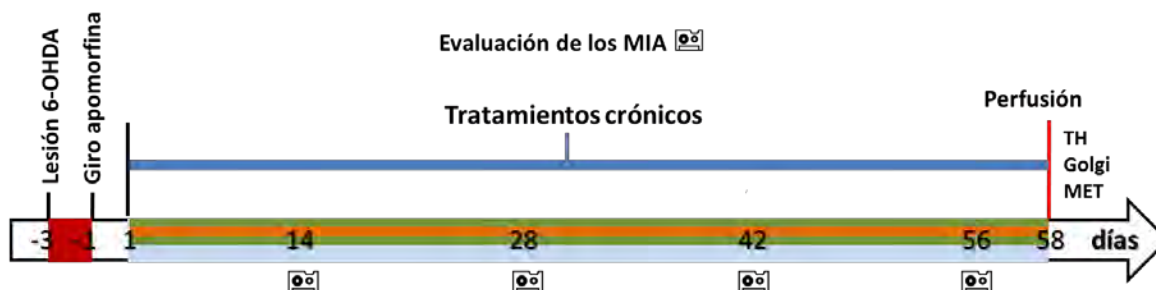


Figura 3. Sesiones de evaluación de MIA. Videograbación de los MIA cada 14 días durante el tiempo de tratamiento. Al término del mismo, las ratas se sacrificaron y se prepararon las muestras del cerebro para los distintos análisis citológicos.

11.4. Preparación del tejido histológico

58 días después de iniciado el tratamiento, todos los grupos incluyendo CTRL y ST fueron perfundidos por vía aórtica bajo anestesia profunda con pentobarbital. Primero se perfundió con solución salina al 0.9% y después la solución fijadora con glutaraldehído/paraformaldehído al 2% en solución buffer de fosfatos (PB) 0.1 M. Los cerebros fueron removidos y embebidos en la misma solución fijadora por una hora.

11.5. Inmunohistoquímica anti-tirosina hidroxilasa (TH)

Se obtuvieron secciones coronales del mesencéfalo de 50 μm de espesor con un vibratomo (Pelco 101, Ted Pella Inc, EUA) para el marcaje con el anticuerpo para TH (1:1000, Chemicon International Inc. CA, EUA) con el método ABC (Vector Lab MI, EUA) para la detección de neuronas catecolaminérgicas. Se analizaron por microscopía de luz con una cámara (Moticam 1000, Motic, EUA) acoplada a un microscopio óptico (Nikon, Japón). Con ayuda del software Motic Image Plus 2.0ML se delimitó el área de conteo en la SNc (1500 μm^2) en cada hemisferio en 7 cortes del mesencéfalo por cada rata (Avila-Costa *et al.*, 2004).

11.6. Impregnación argéntica por el método de Golgi

Los cerebros se procesaron con el método de Golgi rápido (Valverde, 1970). Con un microtomo se obtuvieron cortes coronales 90 μm de espesor, de porciones cerebrales que contenían el cuerpo estriado. El análisis histológico consistió en el conteo de espinas dendríticas en 10 μm de una dendrita secundaria, y en 5 dendritas por neurona, en 10 neuronas espinosas medianas del estriado dorsolateral de cada hemisferio de todos los grupos (Avila-Costa *et al.*, 2004).

11.7. Microscopía electrónica de transmisión

Se obtuvieron fragmentos del estriado dorsolateral de cada hemisferio. Se lavaron en PB y se trataron por 60 minutos con tetraóxido de osmio al 1% en PB para su postfijación. Se lavó de nuevo por 30 minutos en PB y se deshidrataron en un tren de alcohol a diferentes concentraciones (al 60, 70, 80, 96% y finalmente absoluto). Posteriormente se embebió el tejido en araldita. Se realizaron cortes finos de 900 Å en un ultramicrotomo (Reichert-Jung, EUA) y se contrastaron con acetato de uranio y citrato de plomo. El análisis se realizó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL Jem 100CX-II.

11.8. Análisis ultraestructural del estriado dorsolateral

La ultraestructura de una sinapsis definida por una zona de densidad postsináptica frente al menos tres vesículas presinápticas fue el criterio para elegir aleatoriamente 50 botones sinápticos por hemisferio. En cada botón se observó la condición de la membrana y organelos y se midió el diámetro del botón presináptico por sus ejes mayor y menor (Figura 4) directamente desde la pantalla del microscopio con una lente ocular con regla montada en uno de los oculares (Avila-Costa *et al.*, 2004).

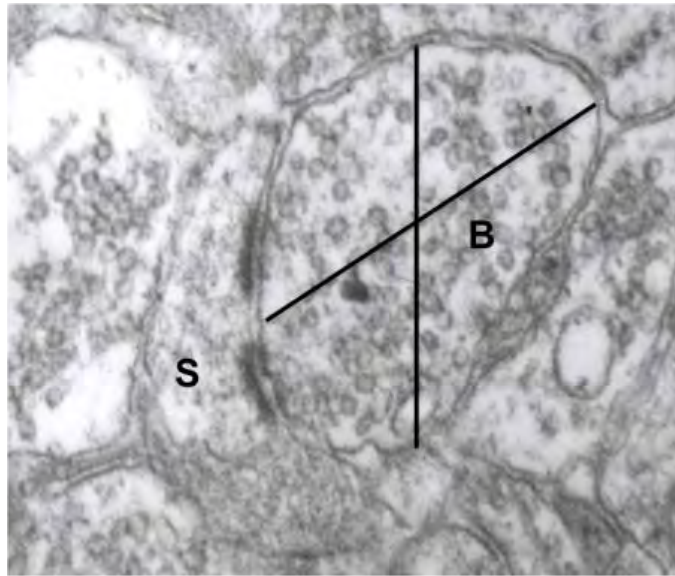


Figura 4. Ultraestructura de la terminal sináptica (B) formando una sinapsis con una espina dendrítica (S), los ejes representan los ejes de medición en cada botón.

11.9. Análisis estadístico

Las discinesias fueron expresadas como la media de los valores totales de cada MIA analizado y se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunnnett para determinar las diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). Para comparar la cantidad de neuronas TH positivas, de espinas dendríticas y las mediciones de los diámetros sinápticos se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los grupos. Los análisis se realizaron con el software Graph Pad Prism 5.0 para Mac (CA, EUA).

12. RESULTADOS

Después de 58 días, no se registró al algún cambio considerable en la masa de los organismos o alteraciones clínicas severas distintas de la capacidad motora en ningún grupo.

12.1. Movimientos involuntarios anormales (MIA)

La suma de los valores de severidad de los cuatro MIA (axial + locomotor + de los miembros superiores + orolinguales) se muestran en la figura 5A. El tratamiento LD-RIM produjo MIA de menor severidad respecto al grupo LD. El tratamiento LD-CSP produjo un efecto similar pero a diferencia del tratamiento LD-RIM, la combinación LD-CSP disminuyó los MIA por un período mayor, aún a los 56 días. Se analizó el desarrollo en el tiempo de los MIA en cada grupo respecto al momento de administración de los fármacos. Las diferencias conductuales entre los grupos experimentales se mantuvieron durante las 4 evaluaciones de los MIA, de las cuales se muestra una figura representativa de la evolución de los MIA a los 42 días (Figura 5B), cuando las diferencias fueron más evidentes. El protocolo de administración de LD utilizado en este estudio corresponde a la inducción de DIL de “pico de dosis” (Nutt, 1990; Cenci *et al.*, 2002). La severidad de los MIA aumentó durante los primeros 60 minutos después de la toma de LD, cuando disminuyó al nivel basal entre los 80 y 140 minutos posteriores. Es notable que los tratamientos con LD-RIM y LD-CSP atenuaron los MIA los primeros minutos cuando el tratamiento con LD inducía MIA más severos en este grupo de ratas. A los 100 minutos estos tres grupos aún manifestaban MIA, principalmente orolinguales.

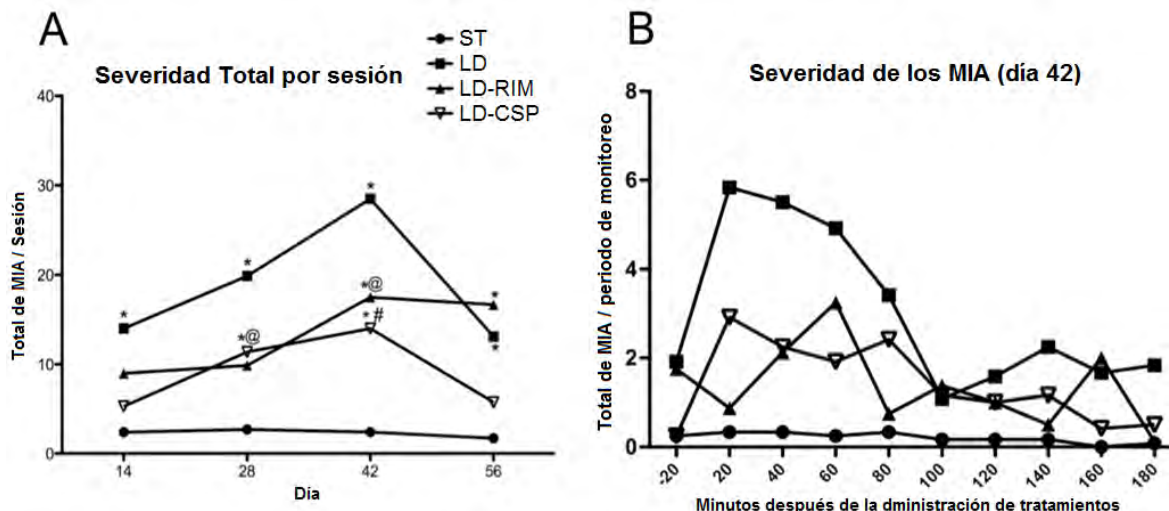


Figura 5. Desarrollo temporal e incidencia de MIA. (A) Desarrollo de total de los MIA durante el tiempo de tratamiento crónico. Los valores representan la suma integral de los valores de severidad de los MIA (locomotor + axial + orolingual + del miembro superior) por día de evaluación por individuo de los cuales se muestra la media para cada grupo (*= $P < 0.001$ LD y los grupos con coadministración de antagonistas vs grupo sin tratamiento (ST); @= $P < 0.005$ LD-RIM vs LD; #= $P < 0.005$ LD-CSP vs LD, Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunnett de comparaciones múltiples. (B) Desarrollo de los MIA totales por tiempo de monitoreo por grupo en una sesión representativa el día 42 de tratamiento.

12.2. Manifestación de subtipos de MIA

Se evaluaron 4 diferentes MIA, los orolinguales (Figura 6A), de los músculos axiales (6B), de miembro superior (6C) y de locomoción. El grupo tratado solo con LD mostró movimientos anormales en músculos axiales, orolinguales y de los brazos que se observaron más severos en los primeros 42 días de tratamiento y disminuyeron drásticamente en severidad a los 56 días. La coadministración de LD-RIM disminuyó significativamente la severidad de los MIA orolinguales desde los primeros 14 días. Los axiales y de los brazos hasta los 42 días. El tratamiento LD-CSP atenuó los MIA en la misma proporción que el LD-RIM a los mismos tiempos, sin embargo la tendencia a la acinesia en los 56 días era notable. En ocasiones el tratamiento con LD-CSP indujo MIA en lado ipsilateral a la lesión y movimientos de la quijada como bostezos durante estiramientos sostenidos de los músculos axiales y de los brazos, éstos se manifestaron con relativa frecuencia y solo en este grupo. Los MIA de tipo locomotor se presentaron en todos los grupos pero con baja severidad y sin diferencias significativas entre grupos por lo que no se muestran en el presente estudio. Ciertos movimientos de giro contralaterales fueron inducidos en todos los grupos pero no eran ejecutados al menos sobre tres extremidades en contacto con el piso por lo que no se consideraron para la evaluación.

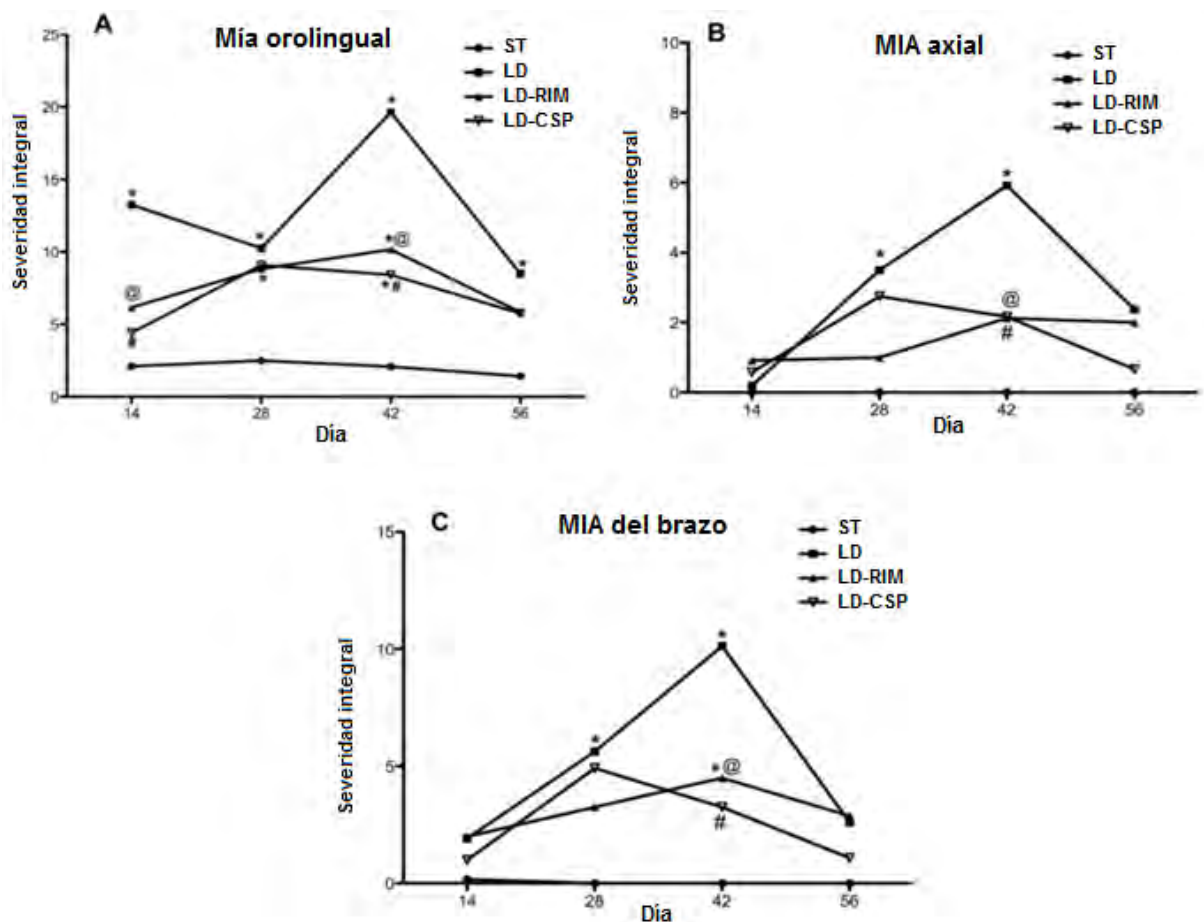


Figura 6. Representación de MIA por subtipo. Se muestra la media de los valores de severidad por cada MIA por grupo por sesión de evaluación. Orolingual (A), Axial (B), del brazo (C). (*= $P < 0.005$ LD y los grupos con coadministración de antagonistas vs grupo ST; @= $P < 0.005$ LD-RIM vs LD; #= $P < 0.005$ LD-CSP vs LD, Kruskal–Wallis seguido de la prueba de Dunnett de comparaciones múltiples.

12.3. Inmunocitoquímica anti-TH

El grupo CT RL no mostró pérdida de neuronas TH positivas en la SNe en ningún hemisferio ($\bar{x}=94 \pm 1.9$ y 93 ± 1.7 contra e ipsilateralmente) (figuras 7 y 8). En contraste encontramos pérdida de estas neuronas en el hemisferio contralateral ($\bar{x}=73 \pm 1.9$) e ipsilateral ($\bar{x}=5 \pm 1.6$) en el grupo ST. El grupo tratado solo con LD perdió neuronas TH positivas significativamente en el hemisferio contralateral ($\bar{x}=59 \pm 1.0$) e ipsilateral ($\bar{x}=6 \pm 2.0$). El grupo LD-RIM perdió neuronas TH positivas en ambos hemisferios pero significativamente menos respecto al grupo LD tanto en el lado contralateral ($\bar{x}=81 \pm 1.8$) como ipsilateral ($\bar{x}=18 \pm 0.9$). Así mismo el tratamiento LD-CSP permitió la preservación de neuronas TH positivas en igual proporción que el tratamiento LD-RIM en el hemisferio contralateral ($\bar{x}=78 \pm 2.2$) e ipsilateral ($\bar{x}=20.3 \pm 1.2$). La figura 8 presenta cortes

representativos de cada grupo donde pueden verse neuronas TH positivas en mayor cantidad en la SNc de los hemisferios ipsilaterales de las ratas de los grupos LD-RIM y LD-CSP, respecto al grupo tratado solo con LD.

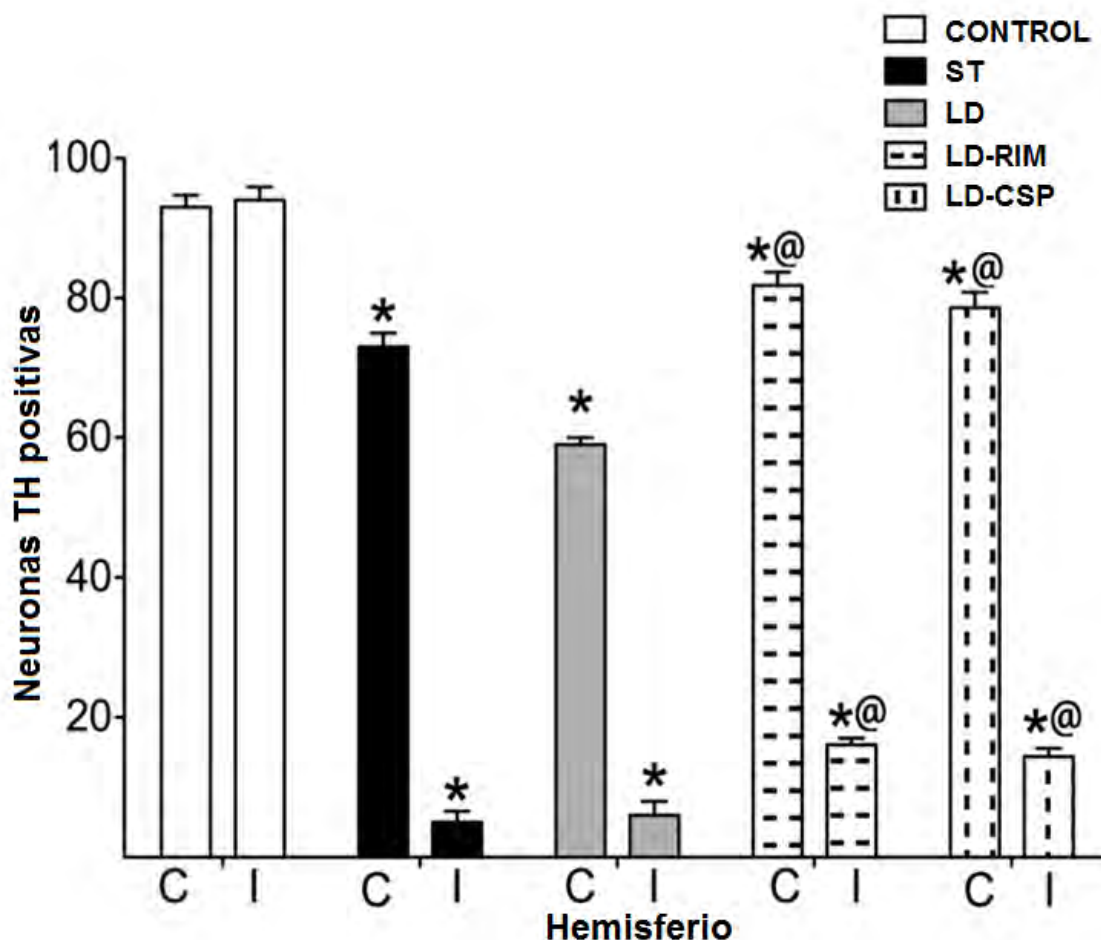


Figura 7. Conteo de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc. Los datos representan la media $\pm$ SEM. Se perdieron significativamente neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc ipsilateral (I) y contralateral (C) a la lesión en todos los grupos lesionados con 6-OHDA. Los grupos tratados con antagonistas presentaron mayor conservación de estas neuronas en ambos hemisferios respecto al grupo tratado con LD y el grupo ST (* = $P < 0.05$ vs CTRL; @ = $P < 0.05$ vs LD; ANOVA de un factor).



Figura 8. Cortes coronales representativos del mesencéfalo mostrando las neuronas TH positivas en la SNc de cada grupo. Se observa la gran pérdida de neuronas TH positivas en el hemisferio ipsilateral (I) en todos los grupos, siendo más severa en el grupo ST y el tratado con LD, en contraste se observan algunas neuronas remanentes TH positivas, en el grupo tratado con LD-RIM y LD-CSP. El hemisferio contralateral (C), en todos los grupos lesionados también presentó menos neuronas TH positivas respecto al grupo control. (Magnificación 100X).

12.4. Análisis citológico

Las figuras 9 y 10 muestran el efecto de cada tratamiento en la densidad de espinas dendríticas de las NEM del estriado dorso lateral. En el grupo C TRL, el hemisferio contralateral ($\bar{x} = 14.7 \pm 0.3$) e ipsilateral ($\bar{x} = 15.23 \pm 0.36$) no presentaron pérdida de espinas (Figuras 9A y 10A). En el grupo ST (Figuras 9B y 10B) y en el LD (Figuras 9C y 10C) se observó pérdida de espinas significativa en ambos hemisferios. El grupo LD-RIM y el grupo LD-CSP perdieron espinas significativamente solo en el lado ipsilateral, donde se encontraron más espinas que en el mismo hemisferio del grupo LD. El análisis "Post hoc" mostró la pérdida significativa de espinas en el grupo LD en comparación a los grupos tratados con LD-RIM y LD-CSP.

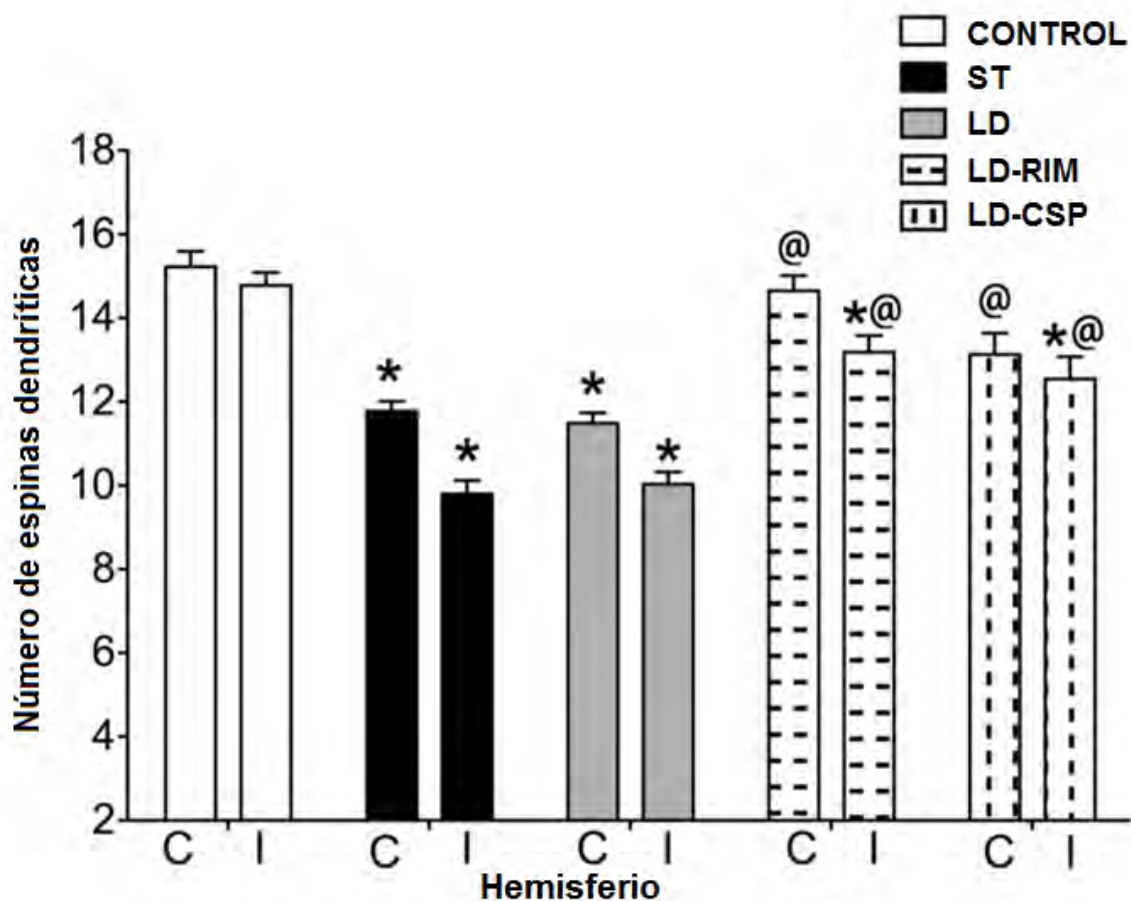


Figura 9. Número de espinas dendríticas de NEM del estriado dorso lateral. El análisis con el método de Golgi permite observar la densidad de espinas dendríticas en el hemisferio (I) ipsilateral y contralateral (C) en cada grupo después del tratamiento crónico respectivo por 58 días. (Media ± SEM. * = $P < 0.05$ vs grupo control; @ = $P < 0.05$ vs LD; ANOVA de un factor).

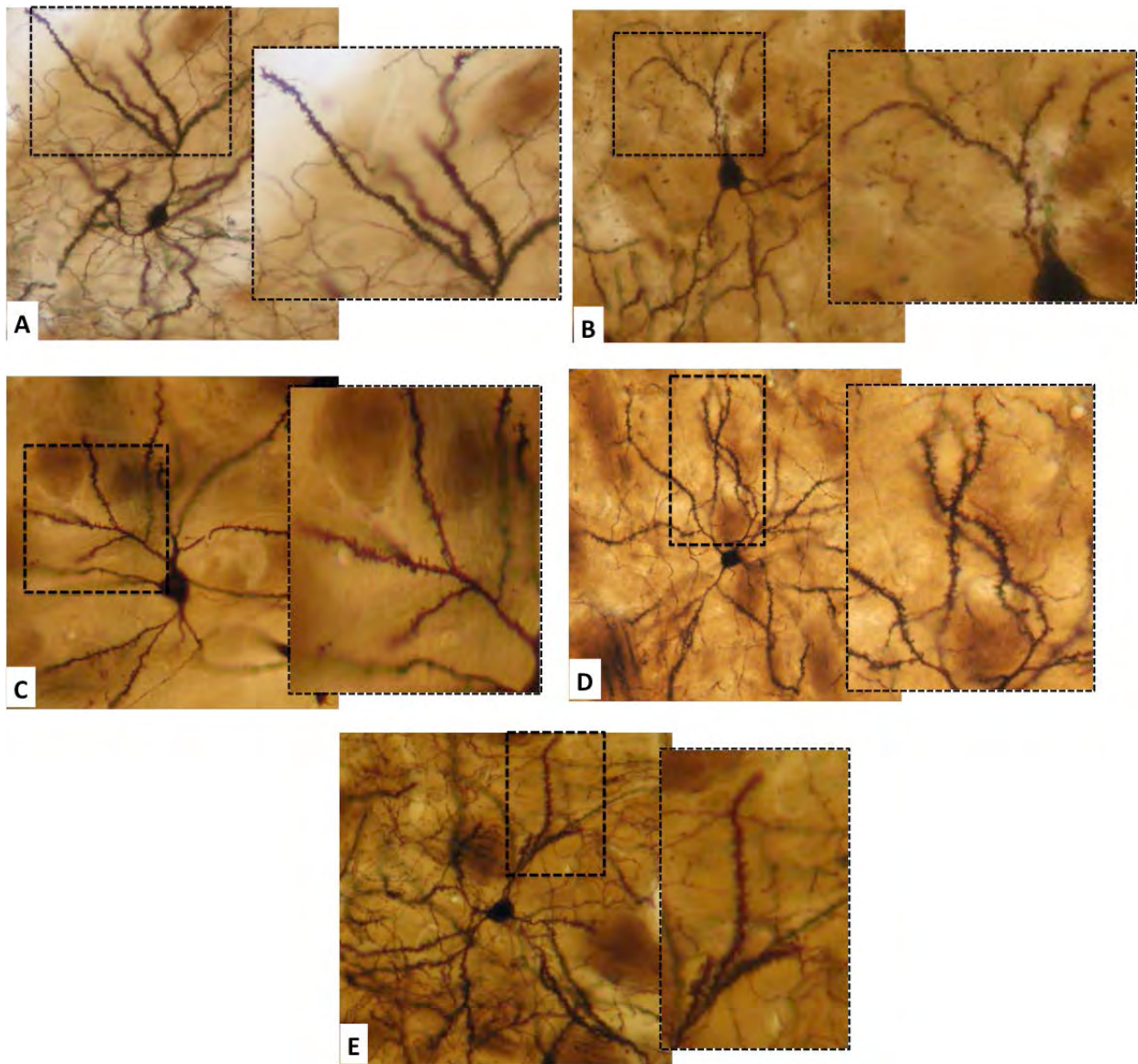


Figura 10. Cortes representativos con impregnación argéntica de NEM del estriado dorsolateral ipsilateral por el método de Golgi. Los recuadros muestran la densidad de las espinas en neuronas representativas de cada grupo. CTRL (A), ST (B), LD (C), LD-RIM (D), LD-CSP (E). Se observa la disminución de espinas dendríticas en el grupo ST y LD, en contraste con la mayor densidad preservada en los grupos LD-RIM y LD-CSP. (Magnificación 400X y 1000X)

12.5. Microscopía electrónica de transmisión

La longitud de los ejes mayor y menor de los botones sinápticos en el estriado dorsolateral se muestran en las figuras 11 y 12. En el grupo CTRL el eje mayor midió en promedio 696.8 ± 9.4 nm en el estriado contralateral y 700 ± 9.6 nm en el lado ipsilateral (Figura 11 A y 12A). El eje menor midió en promedio 474.9 ± 9.6 nm en el lado contralateral y 477.0 ± 9.6 en el lado ipsilateral (Figura 11B y 12A). Los botones sinápticos del grupo ST incrementaron su tamaño significativamente ($\bar{x} = 1379 \pm 18$ nm el eje mayor y 980.3 ± 16.13 nm el eje menor) en el lado ipsilateral (Figuras 11A-B y 12B). Este patrón de aumento se encontró en el grupo LD ($\bar{x} = 1340.0 \pm 13.20$ nm el eje mayor y 966.0 ± 12.1 nm el eje menor (Figuras 11A-B y 12C) significativamente diferente al grupo CTRL. Se observaron pocos botones con edema ($\bar{x} = 987 \pm 12.00$ nm eje mayor y 765 ± 13 nm eje menor) en el estriado ipsilateral del grupo tratado con LD-RIM (Figuras 11A-B y 12D). En el estriado ipsilateral del grupo tratado con LD-CSP se encontraron algunos botones hinchados ($\bar{x} = 1078 \pm 12$ nm eje mayor y 878 ± 8.98 nm eje menor) pero no significativamente diferentes del grupo LD-RIM (Figuras 11A-B y 12E). El análisis “*Post hoc*” reveló diferencias significativas del tratamiento LD-RIM y LD-CSP con el LD y el grupo ST mostrando menor número de botones con edema. El diámetro de los botones contralaterales de los todos los grupos lesionados con 6-OHDA no mostró cambios respecto al grupo CTRL (Figuras 11A-B). El neuropilo de los estriados del grupo ST y el LD presentó severas alteraciones como vacuolas y mitocondrias con crestas dilatadas. En los grupos LD-RIM y LD-CSP no se observaron alteraciones de este tipo y el neuropilo estaba bien conservado en general (Figuras 12 D y E).

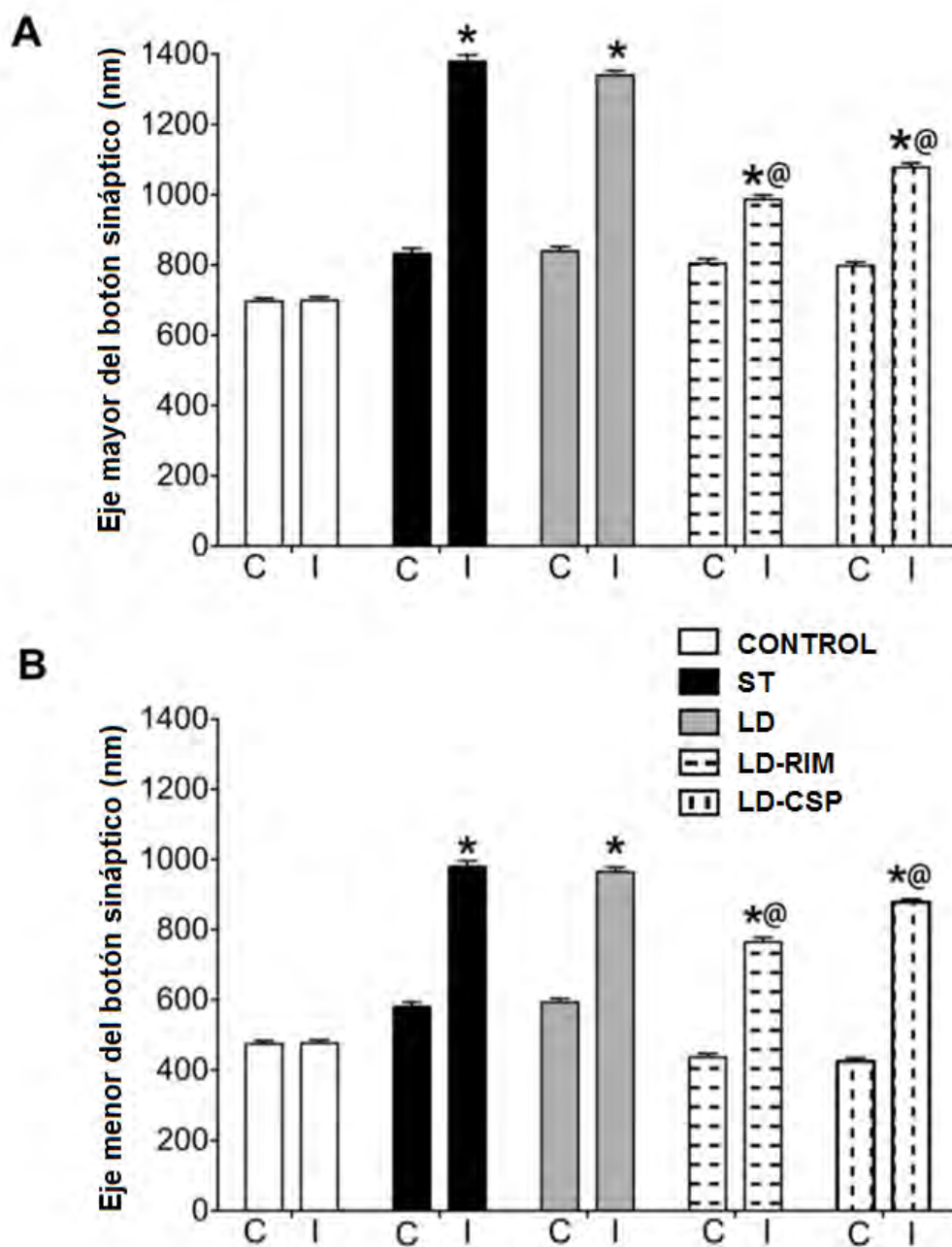


Figura 11. Análisis ultraestructural de las terminales sinápticas en el estriado dorso lateral. Se muestran las longitudes de los ejes mayor (A) y menor (B) de los botones sinápticos en el estriado ipsilateral (I) y contralateral (C). (Media $\pm$ SEM. * = $P < 0.05$ vs CTRL; @ = $P < 0.05$ vs LD; ANOVA de un factor).

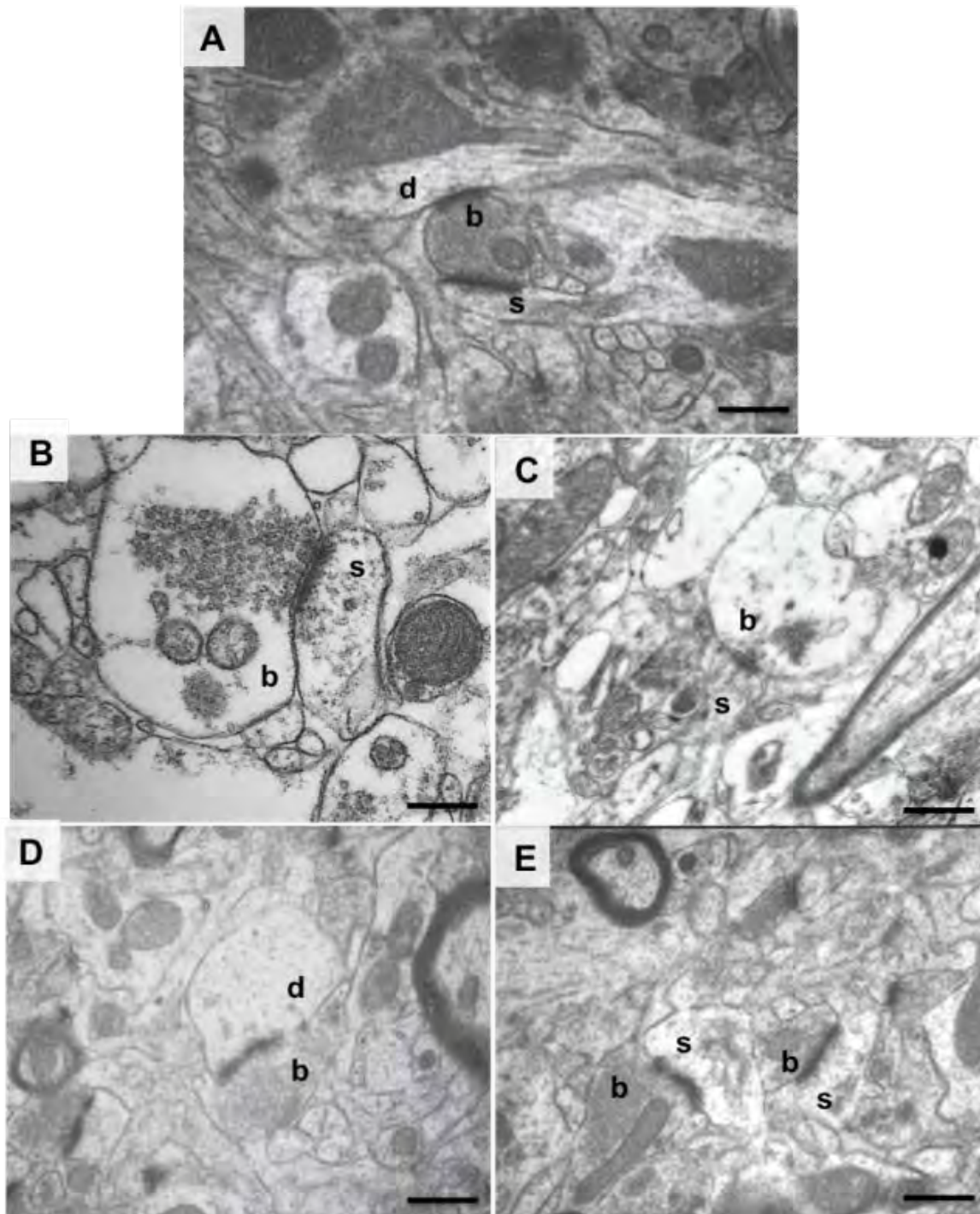


Figura 12. Micrografías electrónicas representativas de la ultraestructura estriatal ipsilateral en cada grupo. El valor medio del botón sináptico fue de 700 x 696 nm en el grupo CTRL (A). Se observa la buena conservación del neuropilo. (B) una terminal sináptica del grupo ST mostrando edema (aumento en el diámetro) en el botón que mantiene un contacto sináptico con una espina dendrítica. Pueden observarse alteraciones en mitocondrias y algunas vacuolas en el neuropilo. (C) Una terminal con gran volumen estableciendo un contacto sináptico con una espina dendrítica y alteraciones en el neuropilo en el grupo tratado con LD. (D) LD-RIM y LD-CSP (E), mostrando botones sinápticos de dimensiones similares a los del grupo CTRL y neuropilo en general bien conservado. Botón sináptico (b), espinas dendríticas (s), dendritas (d), Barra 0.2µm.

13. DISCUSIÓN

Los datos del presente estudio demuestran que la coadministración oral de LD y el antagonista del receptor CB1 (rimonabant) o LD y el antagonista del receptor TRPV1 (capsacepina) producen la reducción de la severidad de los MIA inducidos por la LD, al favorecer la conservación de algunas neuronas dopaminérgicas en la SNc funcionales, promoviendo la mejor preservación de la sinaptología del cuerpo estriado de ambos hemisferios, a diferencia de lo encontrado en los grupos ST y LD.

13.1. MIA

El estado predominante de acinesia de las ratas lesionadas con 6-OHDA del grupo ST corresponde con los hallazgos de otros trabajos, en los cuales describen la relación directa entre el aumento de los niveles de eCB en el cerebro y la acinesia de ratas lesionadas en la vía nigroestriatal (Gubellini *et al.*, 2002; González *et al.*, 2006). En estas ratas, el tratamiento con LD puede revertir la acinesia, probablemente restableciendo los niveles normales de eCB (Maccarrone *et al.*, 2003). La dosis y el tiempo de tratamiento con LD son factores que aumentan la incidencia de DIL (Schrag y Quinn, 2000; Putterman *et al.*, 2007), manifestándose simultáneamente bradicinesia, posturas diestónicas de porciones del cuerpo contralaterales al hemisferio cerebral más degenerado y evidenciando la reducción progresiva del tiempo de beneficio anti-parkinsoniano de la LD (Melamed, 1979; Cubo *et al.*, 2001; Ghassemi *et al.*, 2006). Análogamente al paciente con EP quien presenta un estado acinético cuando han pasado varias horas sin recibir LD, las ratas de todos los grupos evaluados en este estudio manifestaban acinesia en la primera evaluación, 20 minutos antes de la toma de los tratamientos correspondientes a cada grupo. Las DIL de “pico de dosis”, son producidas por la estimulación pulsatil de los receptores de DA en el estriado (Cenci y Lundblad, 2007) y afectan a humanos de manera asimétrica (Mones *et al.*, 1971; Kempster *et al.*, 1989; Nutt, 1990), lo que en el modelo con 6-OHDA se recrea en gran medida por la manifestación predominantemente unilateral de los MIA (Lee *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2002). En este contexto, el bloqueo de receptores CB1 o TRPV1 resultan una buena alternativa para atenuar los MIA inducidos por el tratamiento con LD y otras alteraciones motoras relacionadas (Fernández-Ruiz, 2009).

El tratamiento con LD-RIM redujo notablemente la asimetría motora en el miembro superior contralateral a la lesión disminuyendo la postura diestónica característicamente

inducida con el modelo con 6-OHDA y facilitando la utilización de este miembro para estabilizarse durante la flexión contralateral de los músculos axiales, lo que se reflejó en MIA axiales de baja severidad al no producir la caída de las ratas y al ser interrumpibles por estímulos externos como ruido o ligeros golpes en sus cajas (Cenci y Lundblad, 2007). Esta mejora de la habilidad de la extremidad superior contralateral es consistente con el efecto anti-acinético y atenuante de la asimetría motora del miembro contralateral a la lesión nigroestriatal severa por la administración de rimonabant (Fernandez-Espejo *et al.*, 2005), permitiendo la prolongación del efecto anti-parkinsoniano de la LD y la atenuación de los MIA (Cao *et al.*, 2007 ; Kelsey *et al.*, 2009). En este estudio el rimonabant y la capsacepina indujeron efecto anti-distónico y anti-discinético sin afectar la actividad espontánea normal como la exploración o el erguimiento durante el efecto “on” de la LD, generalmente los primeros 80 minutos después de la toma de los tratamientos correspondientes. Esto concuerda con la participación de otros sistemas fisiológicos distintos al dopaminérgico durante la manifestación de distonía o discinesia y con lo observado con otros fármacos no dopaminérgicos (Dekundy *et al.*, 2007).

Se conoce que las DIL pueden aparecer por primera vez cuando la LD posee el mejor efecto anti-bradicinético y esto hace difícil disociar el efecto anti-parkinsoniano de la LD de su efecto inductor de DIL (Caligiuri y Peterson, 1993). Al respecto, se ha sugerido la existencia de una concentración umbral de DA en el cerebro; alto para la manifestación de DIL y bajo para inducir efecto anti-parkinsoniano en etapas tempranas del tratamiento con LD. Con el avance del tiempo de tratamiento se produce la sensibilización (alteraciones en la síntesis, transporte y sensibilidad de los receptores de DA estriatales) a la LD y disminuye la concentración umbral de DA para desarrollar DIL al nivel del requerido para su efecto anti-parkinsoniano (Kirik *et al.*, 1998; Olanow *et al.*, 2006). En estadios avanzados de la EP disminuye el tiempo del estado “on” anti-parkinsoniano y aumenta el de manifestación de DIL (Nutt *et al.*, 2010). Probablemente la conservación de las neuronas TH en la SNc y citológica en el estriado, promovida por los tratamientos con LD-RIM y LD-CSP, favoreció el mantenimiento de las concentraciones de DA en el estriado dorsolateral cercanas a los de etapas intermedias de DIL, cuando se manifiestan DIL pero durante menos tiempo y con menor severidad (Lee *et al.*, 2000; Carlsson *et al.*, 2005), evitando la liberación excesiva de DA en el estriado y aún en la SNc por la administración exógena de LD que favorece la sensibilización a la DA y la inducción de DIL (Buck *et al.*, 2010; Lindgren *et al.*, 2010).

En c ontraste a nues tros r esultados, e l e fecto paradójico de los a gonistas C B1 en l a reducción de las DIL con otros reportes puede deberse a la diferencia en el tiempo de biodisponibilidad de és tos en el c erebro, as í el ag onista s intético de l r eceptor C B1, WIN5522212 es efectivo 60 minutos después de su administración, aliviando DIL de tipo difásico (Morgese *et al.*, 2007). Esto mismo ocurre en humanos tratados con nabilona, un agonista sintético de C B1 que disminuye el tiempo y severidad de las DIL (Sieradzan *et al.*, 2001). Por el contrario el rimonabant administrado oralmente está biodisponible en el cerebro desde los primeros 20 minutos después de su administración (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1996). Esto es farmacológicamente relevante debido a que el tiempo de biodisponibilidad cerebral es muy similar al de la LD administrada por vía oral y a que la estimulación de los r eceptores de D A y CB1 puede t ener e fectos funcionales muy diferentes si se activan simultáneamente o en momentos diferentes (Glass y Felder, 1997; Vásquez y Lewis, 1999 ; Kearn *et al.*, 2005 ; Gonzalez *et al.*, 2009). O tra di ferencia importante en el tipo de efecto de los agonistas CB1 sobre las DIL está determinado por el modo de administración de LD, así, la administración de tipo “aleatorio crossover” utilizado en varios estudios farmacológicos implica la administración variable de LD tanto en dosis como en t iempos, lo que facilita la complicación de D IL de t ipo “pico de dosis” en DIL difásicas (Mateo *et al.*, 1995). El agonista CB1, HU210 puede atenuar las DIL inducidas por la adm inistración d e t ipo “ crossover”, a tenuando l as DIL di fásicas (Walsh *et al.*, 2010a).

El efecto del rimonabant en el movimiento es dosis dependiente y está determinado por el grado de denervación dopaminérgica y de la respuesta a la LD exógena, de manera que la relativamente dosis baja de rimonabant utilizada en este es tudio c oncuerda c on reportes previos sobre su capacidad terapéutica en la disminución de DIL y otras alteraciones motoras (El-Banoua *et al.*, 2004; Fernandez-Espejo *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2008; Tadaiesky *et al.*, 2010). Esto contrasta con el profundo impacto fisiológico producido por la inactivación del gen de expresión de CB1 en estudios KO-CB1 en ratones que desarrollan un fenotipo con mayor susceptibilidad al daño por 6-OHDA y a desarrollar DIL (Pérez-Rial *et al.*, 2011), pues implica también la alteración de otros procesos fisiológicos distintos de l a t ransmisión s ináptica y el c ontrol m otor en l os q ue l os eCB par ticipan mediante la activación del receptor CB1 (Bisogno y Di Marzo, 2007; Belujon *et al.*, 2010).

Por otro lado el bloqueo del receptor TRPV1 con capsacepina puede facilitar el efecto anti-discinético del inhibidor del metabolismo de AEA, URB597 (Morgese *et al.*, 2007). El aumento en la concentración de AEA producido por este inhibidor en los ganglios basales, principalmente en el estriado puede inducir la activación de TRPV1 contrarrestando el posible efecto anti-discinético de la activación de CB1 con AEA. El bloqueo del receptor TRPV1 con capsacepina puede prevenir este efecto. En el contexto de nuestro estudio obtuvimos además de la disminución de la severidad de las DIL, menor pérdida de neuronas TH positivas que probablemente expresan receptores TRPV1 y que regulan la liberación de DA estriatal (Marinelli *et al.*, 2003). Es posible que la combinación de LD -CSP facilite la transmisión de la vía indirecta en periodos cercanos al “off” como lo es 20 minutos antes de la administración de LD -CSP o 100 minutos después, debido a la presentación de estereotipias como bosquejos y estiramientos (Figura 13) característicamente inducidos con agonistas D2 (Collins *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2008) y regulados con canabinoides en estrecha relación con la concentración de DA en el estriado (Ottani *et al.*, 2002), en oposición a la sobre activación de la vía directa durante la manifestación de DIL (Longoni *et al.*, 1987; Stähle, 1992). No se puede descartar la posibilidad de la activación de los autorreceptores D2 en terminales de la SNc como mecanismo inductor de estas estereotipias en concordancia con la buena preservación de la vía nigroestriatal en este grupo (Ferrari, 1985).

La compensación fisiológica y funcional en ambos hemisferios a causa de la degeneración unilateral de la vía nigroestriatal es diferente entre el estado de reposo y la ejecución de movimiento, de forma que es posible que ocurran variaciones en la actividad neuronal de la SNc distintas en cada hemisferio, según el estado de actividad de la rata (Yang *et al.*, 2007). Tal fenómeno tiene varias implicaciones pues el estriado es la estructura clave en el surgimiento de las DIL y del tipo de MIA manifestados. Una vez establecidas las DIL, el GPe, la SNr y el NST, estructuras que expresan receptores de DA, CB1 y/o TRPV1 son determinantes del grado de severidad de estas DIL (Buck *et al.*, 2010) de manera que la influencia de cada estructura en la ejecución motora varía en cada hemisferio y según la rata esté activa o inactiva. Por otro lado, la conducta de giro contralateral inducido por la LD no es considerada una expresión de DIL pero si un MIA producido por la estimulación de los receptores de DA supersensibilizados en el estriado ipsilateral (Mendez y Finn, 1975; Cenci y Lundblad, 2007). En el presente estudio no observamos la conducta de giro o MIA locomotor consistentemente y ni con diferencias

significativas entre los grupos en tratamiento (datos no mostrados). En todos los grupos tratados, el giro inducido por LD fue ejecutado en su mayoría sobre dos patas y no sobre al menos tres en contacto con la superficie, como lo indica Cenci y colaboradores en su clasificación de los MIA (Cenci y Lundblad, 2007). La inducción consistente de la conducta de giro con LD requiere de dosis altas de LD, mayores a las necesarias para inducir DIL y a la utilizada en este estudio (Lindner *et al.*, 1996; Marin *et al.*, 2006). La evidente habilidad motora de los miembros superiores excluye la posibilidad de que la rigidez, la distonía o los MIA del miembro superior impidan la movilidad de esta extremidad para la locomoción y por lo tanto de la ejecución del MIA de tipo locomotor en el grupo LD-RIM o el LD-CSP (Marin *et al.*, 2006; Dekundy *et al.*, 2007). Es importante mencionar que las ratas tratadas con LD-CSP desarrollaron hipersensibilización (alodinia mecánica) ante estímulos inocuos como la manipulación con las manos durante la administración del tratamiento o el cambio de cajas para la realización de la evaluación de los MIA, un fenómeno que sugiere que este tratamiento también posee efecto en neuronas sensitivas en el sistema nervioso periférico, alterando la percepción del dolor, pues se quejaban al contacto (Patapoutian *et al.*, 2009).



Figura 13. Estereotipias en el estado “off” de las ratas del grupo LD-CSP. En el grupo tratado con LD-CSP se manifestaban frecuentemente bostezos y estiramientos corporales antes de la toma del tratamiento y al caer el “pico de dosis” de LD, 100 minutos después. Estos movimientos y la alodinia mecánica, solo se desarrollaron en este grupo.

13.2. Alteraciones citológicas

La pérdida de neuronas TH positivas en la SNc de los todos grupos lesionados con 6-OHDA en el hemisferio contralateral fue significativamente mayor respecto al grupo CTRL pero menor que en el ipsilateral de todos los grupos lesionados, como se ha reportado en ratas lesionadas en el haz medial de cerebro anterior (Avila-Costa *et al.*, 2005b; Avila-Costa *et al.*, 2008). Probablemente las proyecciones interhemisféricas de la SNc al estriado contralateral ocasionen la degeneración de la SNc contralateral por el transporte anterógrado y retrógrado de la toxina (Fass y Butcher, 1981; Morgan y Huston, 1990; Emsley *et al.*, 2001). Funcionalmente la SNc de un lado regula la actividad de la SNc opuesta (Castellano y Díaz, 1991) así como la recaptura de DA, su síntesis y la interacción entre receptores D1 y D2 (Roedter *et al.*, 2001; Kozlowski *et al.*, 2004). El grado de conservación neuronal en la SNc de los grupos tratados con LD-RIM y LD-CSP fue significativamente mayor respecto a los grupos ST y LD en los dos hemisferios. El rimonabant por sí mismo puede favorecer la supervivencia neuronal por mecanismos independientes del bloqueo CB1 (Pegorini *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 2010). Y el tratamiento con LD-CSP puede favorecer la supervivencia neuronal evitando el influjo excesivo de calcio a través del receptor TRPV1 en neuronas de la SNc (Roedter *et al.*, 2001; Musella *et al.*, 2009).

Puesto que el tiempo de neurotoxicidad de la 6-OHDA se ha estimado en 96 horas desde la inyección intracerebral y de una semana en la disminución mayor de DA en el estriado (Labandeira-Garcia *et al.*, 1996; Zuch *et al.*, 2000), es probable que la administración de los tratamientos con LD-RIM y LD-CSP 36 horas después de la lesión con 6-OHDA, permitan, por mecanismos diferentes, el restablecimiento del fenotipo TH positivo en neuronas de la SNc parcialmente afectadas por la toxina (Sauer y Oertel, 1994; Bowenkamp *et al.*, 1996; Rosenblad *et al.*, 1999) impidiendo la muerte neuronal (Zuch *et al.*, 2000). El rimonabant a su vez puede remover el control tónico que los eCB ejercen sobre la SNc facilitando su actividad y la liberación de DA en el estriado (Gueudet *et al.*, 1995), de manera que la capsacepina también puede modular la liberación de DA en el estriado de ambos hemisferios (de Lago *et al.*, 2004). Esta conservación puede favorecer el metabolismo de la DA y su almacenamiento vesicular en las terminales remanentes en el estriado ipsilateral produciendo variaciones en la concentración de DA, menos drásticas en comparación con lo ocurrido en el grupo ST y LD (Kirik *et al.*, 1998; Carlsson *et al.*, 2005). Otro factor importante en la supervivencia neuronal de la SNc es el control de las

aferencias excitatorias en la SNc por TRPV1 (Overton y Clark, 1997; Marinelli *et al.*, 2003) y por CB1 o TRPV1 en el estriado reduciendo la excitotoxicidad inducida por la sobreactividad del NST y la corteza (Gonzalez *et al.*, 2006; Musella *et al.*, 2009) causados por la denervación dopaminérgica, y potencialmente inductores de muerte neuronal en esta condición (Gubellini *et al.*, 2002).

La conservación de espinas dendríticas en las NEM del estriado dorsolateral promovida por los tratamientos con LD-RIM y LD-CSP podría deberse en parte, a la modulación de la sobreactividad de la transmisión glutamatérgica en el estriado desde la presinapsis excitatoria (Gubellini *et al.*, 2002). El rimonabant posee la capacidad de influir en la liberación de glutamato en el estriado (Meschler *et al.*, 2001). Esta conservación de espinas puede mantener la capacidad parcial de revertir las alteraciones de plasticidad sináptica propias de las discinecias, como la pérdida de la capacidad de inhibición de largo plazo de la liberación de neurotransmisores (LTD) y con ello regular la actividad neuronal de las NEM (Maccarrone *et al.*, 2003; Picconi *et al.*, 2003; Casteels *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2010b). Esto es crucial para el efecto anti-discinético de los tratamientos LD-RIM y LD-CSP, pues la innervación dopaminérgica en el estriado dorsolateral determina la severidad de los MIA axiales, orolinguales y del miembro superior. La funcionalidad de las conexiones dopaminérgicas remanentes es importante para la manifestación misma de las DIL (Schuster *et al.*, 2009; Soderstrom *et al.*, 2010) y la pérdida de espinas en el grupo tratado con LD sugiere la pérdida de contactos sinápticos y la alteración del volumen y perímetro membranal, lo cual implica la modificación de la excitabilidad de las NEM (Rall, 1962; Arbuthnott *et al.*, 1998; Neely *et al.*, 2007).

Esto a la vez corresponde con la baja presencia de botones con edema en el estriado de las ratas tratadas con LD-RIM y LD-CSP. La alteración funcional de proteínas como los receptores de glutamato y los canales de calcio en estadios avanzados de la EP y DIL (Surmeier *et al.*, 1995) son consecuencia de la pérdida del control dopaminérgico fisiológico por la cual la interacción de receptores de DA y CB1 en la misma vía de transducción de señales dependiente de AMPc, su competencia por las mismas proteínas G y su efecto en la actividad de la adenilato ciclasa en las NEM, puede ser el mecanismo por el cual se disminuya la severidad de las DIL (Meschler *et al.*, 2001). En este mismo sentido el receptor TRPV1 también funciona según la activación de esta vía de transducción de señales aunque su interacción con los receptores de DA se conoce

menos que en el caso de los CB1 (Glass y Felder, 1997), su actividad depende de enzimas como la fosfolipasa C (PLC), la proteína cinasa A (PKA) y C (PKC) (Netzeband *et al.*, 1999; De Petrocellis *et al.*, 2001b; Vellani *et al.*, 2001). La compleja interacción de estos receptores en el estriado y su localización presináptica, postsináptica, membranal o intracelular y sus estados de activación y de las vías de señalización concomitantes pueden ser los posibles mecanismos para que cada uno de estos dos antagonistas (rimonabant o capsacepina) en coadministración con LD posean efecto funcional y citológico tan similar en esta condición patológica (Bisogno y Di Marzo, 2007).

Respecto a las alteraciones ultraestructurales bilaterales en el estriado dorsolateral, el grupo ST mostró botones sinápticos con edema en concordancia con estudios previos con ratas sin tratamiento (Avila-Costa *et al.*, 2005a; Avila-Costa *et al.*, 2008) y tratadas con LD con DIL (Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2012). Esto contrasta con la observación de que en monos lesionados con MPTP no se observan alteraciones en el volumen del botón sináptico en el estriado muy probablemente a causa de la diferencia en el modelo animal utilizado (Raju *et al.*, 2008). Los tratamientos con LD-RIM y LD-CSP previnieron la presencia de edema como lo observado con el agonista de receptores D2, bromocriptina (Avila-Costa *et al.*, 2005b). En el estriado, los eCB ejercen control tónico inhibitorio de las NEM mediante la activación de receptores CB1, la infusión estriatal de rimonabant puede remover este control tónico y facilitar conductas motoras dependientes de la activación de receptores D1 e inhibir las dependientes de D2 (El-Banoua *et al.*, 2004). Sin embargo en nuestro estudio, la distribución y la farmacodinámica cerebral del rimonabant administrado oralmente (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1995; Rinaldi-Carmona *et al.*, 1996), probablemente interrumpió el efecto de la coactivación fisiológica de receptores CB1 y de DA al ser administrada la LD-RIM al mismo tiempo y tener un tiempo de distribución muy similar, lo anterior puede ser clave en el efecto de la conservación de la sinaptología funcional estriatal (Przybyla y Watts, 2010). La farmacología de la capsacepina es menos conocida y puede llevar a efectos opuestos debido incluso a su capacidad para activar canales de calcio o receptores nicotínicos (Szallasi, 2006), pero también puede evitar la muerte neuronal desencadenada por la activación de CB1 y la activación indirecta de TRPV1 (Pegorini *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). En ratas lesionadas sin tratamiento como las del grupo ST de nuestro estudio, la excitabilidad de las NEM del estriado aumenta en las estriatopalidales (que expresan D2) y disminuye en las estriatonigrales (que expresan D1), esta situación en combinación con el aumento en la transmisión glutamatérgica

aferente (Rylander *et al.*, 2009) produce cambios morfológicos en la sinaptología estriatal, principalmente el aumento del tamaño de la densidad postsináptica (Ingham *et al.*, 1998), lo cual también ocurre en humanos (Anglade *et al.*, 1996) y concuerda con el estado predominante de potenciación de largo plazo (LTP), irreversible en ratas que manifiestan DIL (Picconi *et al.*, 2003). Los eCB son fundamentales en este tipo de plasticidad sináptica, sin embargo los mecanismos por los cuales la coadministración de LD-RIM o LD-CSP puedan restablecer la capacidad de la LTD y disminuir la severidad de las DIL quedan para estudios posteriores, aunque es probable que se deba a una compleja interacción entre los receptores CB1, TRPV1, y de DA en el estriado, y en estructuras como el GP, el NST y la corteza, cuya actividad determina la evolución de DIL y otras complicaciones motoras inducidas por la respuesta anómala al tratamiento oral con LD.

14. CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que la coadministración oral de LD-RIM o LD-CSP pueden disminuir significativamente la severidad de los MIA orolinguales, del miembro superior y de los músculos axiales, con una fenomenología de DIL de “pico de dosis”. Durante las observaciones conductuales notamos disminución de las posturas distónicas del miembro superior contralateral al hemisferio lesionado con 6-OHDA y de la bradicinesia durante los primeros 100 minutos, en todos los tiempos de evaluación durante el tratamiento crónico por 58 días. Esta recuperación motora corresponde con la preservación de más neuronas dopaminérgicas en la SNc ipsilateral y contralateral respecto a lo observado con el tratamiento con LD o en el grupo lesionado sin tratamiento. Lo mismo ocurre con la inducción de estos tratamientos, LD-RIM y LD-CSP de preservar mayor número de espinas dendríticas en las NEM del estriado dorsolateral y de su ultraestructura sináptica y del neuropilo. La evidencia experimental sugiere que el bloqueo del receptor CB1 es una alternativa en la modulación de la vía indirecta sobre activada durante la manifestación de las DIL y que el receptor TRPV1 puede ser un factor inductor de DIL, por lo cual su bloqueo por la administración oral de CSP es efectivo en la atenuación de las DIL y las alteraciones citológicas inducidas por la lesión con 6-OHDA. La única diferencia conductual observada entre los tratamientos con LD-RIM y el LD-CSP fue la evidente hipersensibilidad a estímulos ino cuos como el contacto mecánico al manipularlas con las manos (alodinia mecánica) y los ocasionales bostezos y estiramientos estereotipados no manifestados en las ratas tratadas con LD o LD-RIM. La combinación oral LD-RIM parece ser más viable en la utilización como terapia en coadministración con LD. Los mecanismos para estos efectos quedan por determinarse en estudios posteriores.

15. LITERATURA CITADA

- Ahlskog J, Muentner M (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16:448-506.
- Anaya-Martínez V, Martínez-Marcos A, Martínez-Fong D, Aceves J, Erij D (2006) Substantia nigra compacta neurons that innervate the reticular thalamic nucleus in the rat also project to striatum or globus pallidus: implications for abnormal motor behavior. *Neuroscience* 143:477-486.
- Anglade P, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch E (1996) Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *Neurodegeneration* 5:121-128.
- Arbuthnott GW, Ingham CA, Wickens JR (1998) Modulation by dopamine of rat corticostriatal input. *Adv Pharmacol* 42:733-736.
- Avila-Costa M, Colín-Barenque L, Aley-Medina P, Gutiérrez AL, Ordóñez JL, Flores E, Fortoul TI (2005a) Bilateral increase of perforated synapses after unilateral dopamine depletion. *Int J Neurosci* 115:79-86.
- Avila-Costa M, Gutiérrez-Valdez A, Ordóñez-Librado J, Martínez V, Colín-Barenque L, Espinosa-Villanueva J, Aley-Medina P, Montiel-Flores E, Velazquez-Mata A, Machado-Salas J P (2008) Time course changes of the striatum neuropil after unilateral dopamine depletion and the usefulness of the contralateral striatum as a control structure. *Neurol Res* 30:1068-1074.
- Avila-Costa MR, Montiel Flores E, Colín-Barenque L, Ordóñez JL, Gutiérrez AL, Niño-Cabrera HG, Mussali-Galante P, Fortoul TI (2004) Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochem Res* 29:1365-1369.
- Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Montiel-Flores E, Aley-Medina P, Gutiérrez AL, Ordóñez JL, Flores E, Anaya V, Mussali-Galante P, Fortoul TI (2005b) Bromocriptine treatment in a murine Parkinson's model: ultrastructural evaluation after dopaminergic deafferentation. *Int J Neurosci* 115:851-859.
- Beltramo M, Piomelli D (2000) Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Neuroreport* 11:1231-1235.
- Belujon P, Lodge DJ, Grace AA (2010) Aberrant striatal plasticity is specifically associated with dyskinesia following levodopa treatment. *Mov Disord* 25:1568-1576.
- Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, Hallett M (2001) Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain* 124:2131-2146.
- Bisogno T, Di Marzo V (2007) Short- and long-term plasticity of the endocannabinoid system in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Res* 56:428-442.
- Bowenkamp KE, David D, Lapchak PL, Henry MA, Granholm AC, Hoffer BJ, Mahalik TJ (1996) 6-hydroxydopamine induces the loss of the dopaminergic phenotype in substantia nigra neurons of the rat. A possible mechanism for restoration of the nigrostriatal circuit mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Brain Res* 111:1-7.
- Brotchie J, Fox S, Henry B, Hille C, Maneuf Y, McGuire S, Peggs D, Crossman A (1998) The cannabinoid receptor antagonist SR141716A reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the MPTP-treated primate model of Parkinson's disease. *Brit J Pharm Proceed Suppl* 123:66.
- Buck K, Voehringer P, Ferger B (2010) Site-specific action of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in the striatum but not globus pallidus and substantia nigra pars reticulata evokes dyskinetic movements in chronic L-3,4-dihydroxyphenylalanine-treated 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience* 166:355-358.
- 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* 9:1106-1117.
- Caligiuri MP, Peterson S (1993) A quantitative study of levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 6:89-98.
- Cao X, Liang L, Hadcock JR, Iredale PA, Griffith DA, Menniti FS, Factor S, Greenamyre JT, Papa SM (2007) Blockade of cannabinoid type 1 receptors augments the antiparkinsonian action of levodopa without affecting dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 323:318-326.

- Carlsson T, Winkler C, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Cenci A, Bjorklund A, Kirik D (2005) Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors. *Brain* 128:559-569.
- Carroll C, Bain P, Teare L, Liu X, Joint C, Wroath C, Parkin S, Fox P, Wright D, Hobart J, Zajicek J (2004) Cannabis for dyskinesia in Parkinson disease: a randomized double-blind crossover study. *Neurology* 63:1245-1295.
- Casteels C, Lauwers E, Baitar A, Bormans G, Baekelandt V, Van Laere K (2010) In vivo type 1 cannabinoid receptor mapping in the 6-hydroxydopamine lesion rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1316:153-162.
- Castellano MA, Díaz MR (1991) Nigrostriatal Dopaminergic Cell-Activity Is under Control by Substantia-Nigra of the Contralateral Brain Side - Electrophysiological Evidence. *Brain Res Bull* 27:213-218.
- Caterina MJ, Julius D (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24:487-517.
- Cenci MA, Lundblad M (2007) Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci Chapter 9:Unit 9 25*.
- Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T (2002) Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 3:574-579.
- Coelho M, Ferreira JJ (2012) Late-stage Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 8:435-442.
- Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH (2011) Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. *Nat Rev Neurosci* 12:359-366.
- Collins GT, Witkin JM, Newman AH, Svensson KA, Grundt P, Cao J, Woods JH (2005) Dopamine agonist-induced yawning in rats: a dopamine D3 receptor-mediated behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 314:310-319.
- Conti L, Johannesen J, Musty R, Consroe P (1987) Anti-dyskinetic effects of cannabidiol. *Proceed Int Cong Marijuana Melb, Australia: Melbourne University Press* 21.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9371-9376.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139:1405-1415.
- Cubo E, Gracies JM, Benabou R, Olanow CW, Raman R, Leurgans S, Goetz CG (2001) Early morning off-medication dyskinesias, dystonia, and choreic subtypes. *Arch Neurol* 58:1379-1382.
- Chevalere V, Takahashi KA, Castillo PE (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29:37-76.
- Damier P, Hirsch E, Agid Y, Graybiel A (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122 (Pt 8):1437-1485.
- de Lago E, de Miguel R, Lastres-Becker I, Ramos JA, Fernández-Ruiz J (2004) Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: in vivo and in vitro evidence. *Brain Res* 1007:152-159.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Davis J, Pertwee R, Di Marzo V (2000) Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett* 483:52-58.
- De Petrocellis L, Bisogno T, MacCarrone M, Davis JB, Finazzi-Agro A, Di Marzo V (2001a) The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J Biol Chem* 276:12856-12863.
- De Petrocellis L, Harrison S, Bisogno T, Tognetto M, Brandi I, Smith GD, Creminon C, Davis JB, Geppetti P, Di Marzo V (2001b) The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potentially enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 77:1660-1663.

- Dekundy A, Lundblad M, Danysz W, Cenci MA (2007) Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behav Brain Res* 179:76-89.
- Devane W, Hanus L, Breuer A, Pertwee R, Stevenson L, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1955.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-613.
- Di Filippo M, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Rossi A, Calabresi P (2008) The endocannabinoid system in Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 14:2337-2347.
- Di Marzo V (2011) Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat Neurosci* 14:9-15.
- Di Marzo V, Lastres-Becker I, Bisogno T, De Petrocellis L, Milone A, Davis JB, Fernández-Ruiz JJ (2001a) Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. *Eur J Pharmacol* 420:123-131.
- Di Marzo V, Lastres-Becker I, Bisogno T, De Petrocellis L, Milone A, Davis J, Fernández-Ruiz J (2001b) Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. *European journal of pharmacology* 420:123-154.
- Di Marzo V, Bisogno T, Melck D, Ross R, Brockie H, Stevenson L, Pertwee R, De Petrocellis L (1998) Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett* 436:449-503.
- Dodel RC, Berger K, Oertel WH (2001) Health-related quality of life and healthcare utilisation in patients with Parkinson's disease: impact of motor fluctuations and dyskinesias. *Pharmacoeconomics* 19:1013-1038.
- Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68:384-386.
- El-Banoua F, Caraballo I, Flores JA, Galan-Rodriguez B, Fernandez-Espejo E (2004) Effects on turning of microinjections into basal ganglia of D(1) and D(2) dopamine receptors agonists and the cannabinoid CB(1) antagonist SR141716A in a rat Parkinson's model. *Neurobiol Dis* 16:377-385.
- Emsley JG, Lu X, Hagg T (2001) Retrograde tracing techniques influence reported death rates of adult rat nigrostriatal neurons. *Exp Neurol* 168:425-433.
- Fahn S (2000) The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol* 47:S2-9; discussion S9-11.
- Fahn S (2006) Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*:1-15.
- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K (2004) Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351:2498-2508.
- Fass B, Butcher LL (1981) Evidence for a crossed nigrostriatal pathway in rats. *Neurosci Lett* 22:109-113.
- Fernandez-Espejo E, Caraballo I, de Fonseca FR, El-Banoua F, Ferrer B, Flores JA, Galan-Rodriguez B (2005) Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol Dis* 18:591-601.
- Fernández-Ruiz J (2009) The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br J Pharmacol* 156:1029-1040.
- Fernández-Ruiz J, Moreno-Martet M, Rodríguez-Cueto C, Palomo-Garo C, Gómez-Canas M, Valdeolivas S, Guaza C, Romero J, Guzmán M, Mechoulam R, Ramos JA (2011) Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br J Pharmacol* 163:1365-1378.
- Fernández-Ruiz J, González S (2005) Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handbook of Exp Pharmacol*:479-986.
- Ferrari F (1985) Sexual excitement and stretching and yawning induced by B-HT 920. *Pharmacol Res Commun* 17:557-564.

- Ferrer B, Asbrock N, Kathuria S, Piomelli D, Giuffrida A (2003) Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci* 18:1607-1614.
- Ferrer I, Martínez A, Blanco R, Dalfó E, Carmona M (2011) Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease. *J Neural Transm* 118:821-839.
- Fowler CJ, Rojo ML, Rodríguez-Gaztelumendi A (2010) Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotection or neurotoxicity? *Exp Neurol* 224:37-47.
- Fox SH, Henry B, Hill M, Crossman A, Brochie J (2002) Stimulation of cannabinoid receptors reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 17:1180-1187.
- François C, Savy C, Jan C, Tandé D, Hirsch E, Yelnik J (2000) Dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the normal state, in MPTP-treated monkeys, and in Parkinson's disease patients. *J Comp Neurol* 425:121-129.
- Frankel JP, Hughes A, Lees AJ, Stern GM (1990) Marijuana for parkinsonian tremor. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53:436.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guijarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D (2012) A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* 15:64-69.
- Fusco FR, Martorana A, Giampa C, De March Z, Farini D, D'Angelo V, Sancesario G, Bernardi G (2004) Immunolocalization of CB1 receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse* 53:159-167.
- Gaenslen A, Swid L, Liepelt-Scarfone I, Godau J, Berg D (2011) The patients' perception of prodromal symptoms before the initial diagnosis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:653-658.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Amer Chem Soc* 86:1646-1647.
- García-Arencibia M, García C, Fernández-Ruiz J (2009) Cannabinoids and Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8:432-439.
- Ghassemi M, Lemieux S, Jog M, Edwards R, Duval C (2006) Bradykinesia in patients with Parkinson's disease having levodopa-induced dyskinesias. *Brain Res Bull* 69:512-518.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Mechoulam R, Offen D (2003) The CB1 cannabinoid receptor agonist, HU-210, reduces levodopa-induced rotations in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Pharmacol Toxicol* 93:66-70.
- Giuffrida A, McMahon LR (2010) In vivo pharmacology of endocannabinoids and their metabolic inhibitors: therapeutic implications in Parkinson's disease and abuse liability. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 91:90-103.
- Glass M, Felder CC (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17:5327-5333.
- Goetz CG (2011) The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a008862.
- Gonzalez B, Paz F, Florán L, Aceves J, Erlij D, Florán B (2009) Cannabinoid agonists stimulate [3H]GABA release in the globus pallidus of the rat when G(i) protein-receptor coupling is restricted: role of dopamine D2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 328:822-828.
- González S, Scorticati C, García-Arencibia M, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz J (2006) Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1073-1074:209-219.
- Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agro A, Maccarrone M (2002) Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci* 22:6900-6907.
- Gueudet C, Santucci V, Rinaldi-Carmona M, Soubrié P, Le Fur G (1995) The CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A affects A9 dopamine neuronal activity in the rat. *Neuroreport* 6:1421-1426.
- Gutiérrez-Valdez AL, Naya-Martínez V, Ordóñez-Librado JL, García-Ruiz R, Torres-Esquivel C, Moreno-Rivera M, Sanchez-Betancourt J, Montiel-Flores E, Avila-Costa MR (2012) Effect of

- chronic L-dopa or melatonin treatments after dopamine deafferentation in rats: dyskinesia, motor performance, and cytological analysis. *ISRN Neurol* 2012:360379.
- Hajos M, Svensson K, Nissbrandt H, Obal F, Jr., Carlsson A (1986) Effects of capsaicin on central monoaminergic mechanisms in the rat. *J Neural Transm* 66:221-242.
- Halliday G, Lees A, Stern M (2011) Milestones in Parkinson's disease--clinical and pathologic features. *Mov Disord* 26:1015-1021.
- Hansen HH, Azcoitia I, Pons S, Romero J, García-Segura LM, Ramos JA, Hansen HS, Fernández-Ruiz J (2002) Blockade of cannabinoid CB(1) receptor function protects against in vivo disseminating brain damage following NMDA-induced excitotoxicity. *J Neurochem* 82:154-158.
- Hermann H, De L, Bisogno T (2003) Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cell Mol Life Sci* 60:607-616.
- Howlett A, Blume L, Dalton G (2010) CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr Med Chem* 17:1382-1475.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:345-358.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8400-8405.
- Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1993) Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626:167-174.
- Ingham CA, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW (1998) Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Neurosci* 18:4732-4743.
- Iravani MM, Jenner P (2011) Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. *J Neural Transm* 118:1661-1690.
- Jan C, Francois C, Tande D, Yelnik J, Tremblay L, Agid Y, Hirsch E (2000) Dopaminergic innervation of the pallidum in the normal state, in MPTP-treated monkeys and in parkinsonian patients. *Eur J Neurosci* 12:4525-4535.
- Jordt SE, Julius D (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* 108:421-430.
- Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, Kim D, Oh U (1999) Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci* 19:529-538.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto T, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89:309-380.
- Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M (2005) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* 67:1697-1704.
- Kelsey JE, Harris O, Cassin J (2009) The CB(1) antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 203:304-307.
- Kempster PA, Gibb WR, Stern GM, Lees AJ (1989) Asymmetry of substantia nigra neuronal loss in Parkinson's disease and its relevance to the mechanism of levodopa-related motor fluctuations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52:72-76.
- Kim SR, Bok E, Chung YC, Chung ES, Jin BK (2008) Interactions between CB(1) receptors and TRPV1 channels mediated by 12-HPETE are cytotoxic to mesencephalic dopaminergic neurons. *Br J Pharmacol* 155:253-264.
- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A (1998) Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152:259-277.
- Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS (1997) The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 17:3525-3537.

- Kozlowski DA, Miljan EA, Bremer EG, Harrod CG, Gerin C, Connor B, George D, Larson B, Bohn MC (2004) Quantitative analyses of GFR α -1 and GFR α -2 mRNAs and tyrosine hydroxylase protein in the nigrostriatal system reveal bilateral compensatory changes following unilateral 6-OHDA lesions in the rat. *Brain Res* 1016:170-181.
- Labandeira-Garcia J, Rozas G, Lopez-Martin E, Liste I, Guerra M (1996) Time course of striatal changes induced by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway, as studied by combined evaluation of rotational behaviour and striatal Fos expression. *Exp Brain Res* 108:69-153.
- Lang AE (2007) The progression of Parkinson disease: a hypothesis. *Neurology* 68:948-952.
- Lastres-Becker I, De Miguel R, De Petrocellis L, Makriyannis A, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J (2003) Compounds acting at the endocannabinoid and/or endovanilloid systems reduce hyperkinesia in a rat model of Huntington's disease. *Journal of neurochemistry* 84: 1097-1109.
- Lastres-Becker I, Cebeira M, de Ceballos M, Zeng B, Jenner P, Ramos J, Fernández-Ruiz J (2001) Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci* 14:1827-1859.
- Lee CS, Cenci MA, Schulzer M, Bjorklund A (2000) Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain* 123 (Pt 7):1365-1379.
- Lee J, Di Marzo V, Brochie JM (2006) A role for vanilloid receptor 1 (TRPV1) and endocannabinoid signalling in the regulation of spontaneous and L-DOPA induced locomotion in normal and reserpine-treated rats. *Neuropharmacology* 51:557-565.
- Linazasoro G, Antonini A, Maguire RP, Leenders KL (2004) Pharmacological and PET studies in patient's with Parkinson's disease and a short duration-motor response: implications in the pathophysiology of motor complications. *J Neural Transm* 111:497-509.
- Lindgren HS, Ohlin KE, Cenci MA (2009) Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in L-DOPA-induced angiogenic activity in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology* 34:2477-2488.
- Lindgren HS, Andersson DR, Lagerkvist S, Nissbrandt H, Cenci MA (2010) L-DOPA-induced dopamine efflux in the striatum and the substantia nigra in a rat model of Parkinson's disease: temporal and quantitative relationship to the expression of dyskinesia. *J Neurochem* 112:1465-1476.
- Lindner MD, Plone MA, Francis JM, Emerich DF (1996) Validation of a rodent model of Parkinson's Disease: evidence of a therapeutic window for oral Sinemet. *Brain Res Bull* 39:367-372.
- Longoni R, Spina L, Di Chiara G (1987) Permissive role of D-1 receptor stimulation by endogenous dopamine for the expression of postsynaptic D-2-mediated behavioural responses. Yawning in rats. *Eur J Pharmacol* 134:163-173.
- Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002) Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15:120-132.
- Maccarrone M, Gubellini P, Bari M, Picconi B, Battista N, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agro A, Calabresi P (2003) Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. *J Neurochem* 85:1018-1025.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992a) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and *in situ* hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48:655-668.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992b) Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci Lett* 148:173-176.
- Marin C, Rodriguez-Oroz MC, Obeso JA (2006) Motor complications in Parkinson's disease and the clinical significance of rotational behavior in the rat: have we wasted our time? *Exp Neurol* 197:269-274.
- Marinelli S, Di Marzo V, Berretta N, Matias I, Maccarrone M, Bernardi G, Mercuri NB (2003) Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat

- substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci* 23: 3136-3144.
- Martín AB, Fernandez-Espejo E, Ferrer B, Gorriti MA, Bilbao A, Navarro M, Rodriguez de Fonseca F, Moratalla R (2008) Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology* 33:1667-1679.
- Mateo D, Dobato J, Giménez-Roldán S (1995) Aggravation of Parkinson's disease after inadequate use of levodopa in controlled-release preparations. *Neurología (Barcelona, Spain)* 10:7-20.
- Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3:e442.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanuš L, Ligumsky M, Kaminski N, Schatz A, Gopher A, Almog S, Martin B, Compton D (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharm* 50:83-173.
- Melamed E (1979) Early-morning dystonia. A late side effect of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *Arch Neurol* 36:308-310.
- Mendez JS, Finn BW (1975) Use of 6-hydroxydopamine to create lesions in catecholamine neurons in rats. *J Neurosurg* 42:166-173.
- Meschler JP, Howlett AC, Madras BK (2001) Cannabinoid receptor agonist and antagonist effects on motor function in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated non-human primates. *Psychopharmacology (Berl)* 156:79-85.
- Mesnage V, Houeto JL, Bonnet AM, Clavier I, Arnulf I, Cattelin F, Le Fur G, Damier P, Welter ML, Agid Y (2004) Neurokinin B, neurotensin, and cannabinoid receptor antagonists and Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* 27:108-110.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3655-3660.
- Misgeld U (2004) Innervation of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318:107-114.
- Mohapatra DP, Nau C (2005) Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280:13424-13432.
- Mones RJ, Elizan TS, Siegel GJ (1971) Analysis of L-dopa induced dyskinesias in 51 patients with Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 34:668-673.
- Moore AE, Cicchetti F, Hennen J, Isacson O (2001) Parkinsonian motor deficits are reflected by proportional A9/A10 dopamine neuron degeneration in the rat. *Exp Neurol* 172:363-376.
- Morgan S, Huston J (1990) The interhemispheric projection from the substantia nigra to the caudate-putamen as depicted by the anterograde transport of [3H]leucine. *Behav Brain Res* 38:155-217.
- Morgese MG, Cassano T, Cuomo V, Giuffrida A (2007) Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB(1) and TRPV1 receptors. *Exp Neurol* 208:110-119.
- Musella A, De Chiara V, Rossi S, Prosperetti C, Bernardi G, MacCarrone M, Centonze D (2009) TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Mol Cell Neurosci* 40:89-97.
- Neely M, Schmidt D, Deutch A (2007) Cortical regulation of dopamine depletion-induced dendritic spine loss in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 149:457-521.
- Netzeband JG, Conroy SM, Parsons KL, Gruol DL (1999) Cannabinoids enhance NMDA-elicited Ca²⁺ signals in cerebellar granule neurons in culture. *J Neurosci* 19:8765-8777.
- Nomura DK, Hudak CS, Ward AM, Burston JJ, Issa RS, Fisher KJ, Abood ME, Wiley JL, Lichtman AH, Casida JE (2008) Monoacylglycerol lipase regulates 2-arachidonoylglycerol action and arachidonic acid levels. *Bioorg Med Chem Lett* 18:5875-5878.
- Nutt JG (1990) Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations. *Neurology* 40:340-345.
- Nutt JG, Chung KA, Holford NH (2010) Dyskinesia and the antiparkinsonian response always temporally coincide: a retrospective study. *Neurology* 74:1191-1197.

- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M (2008) Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 Suppl 3:S548-559.
- Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F (2006) Drug insight: Continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:382-392.
- Ottani A, Ferrari F, Giuliani D (2002) Neuroleptic-like profile of the cannabinoid agonist, HU 210, on rodent behavioural models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:91-96.
- Overton PG, Clark D (1997) Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 25:312-334.
- Padovan-Neto FE, Echeverry MB, Tumas V, Del-Bel EA (2009) Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 159:927-935.
- Pahwa R, Factor S, Lyons K, Ondo W, Gronseth G, Bonte-Stewart H, Hallett M, Miyasaki J, Stevens J, Weiner W, Quality Standards Subcommittee of the American Academy of N (2006) Practice Parameter: treatment of Parkinson's disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 66:983-995.
- Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ (2009) Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* 8:55-68.
- Patwardhan AM, Jeske NA, Price TJ, Gamper N, Akopian AN, Hargreaves KM (2006) The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11393-11398.
- Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press Third edition, USA.
- Pearce JM (1978) Aetiology and natural history of Parkinson's disease. *Br Med J* 2:1664-1666.
- Pegorini S, Zani A, Braidà D, Guerini-Rocco C, Sala M (2006) Vanilloid VR1 receptor is involved in rimonabant-induced neuroprotection. *Br J Pharmacol* 147:552-559.
- Pérez-Rial S, García-Gutiérrez MS, Molina JA, Pérez-Nievas BG, Ledent C, Leiva C, Leza JC, Manzanares J (2011) Increased vulnerability to 6-hydroxydopamine lesion and reduced development of dyskinesias in mice lacking CB1 cannabinoid receptors. *Neurobiol Aging* 32:631-645.
- Pertwee R (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Current Medicinal Chemistry* 6:635-699.
- Picconi B, Centonze D, Hakansson K, Bernardi G, Greengard P, Fisone G, Cenci MA, Calabresi P (2003) Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci* 6:501-506.
- Pisani V, Madeo G, Tassone A, Sciamanna G, Maccarrone M, Stanzione P, Pisani A (2011) Homeostatic changes of the endocannabinoid system in Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:216-222.
- Pisani V, Moschella V, Bari M, Fezza F, Galati S, Bernardi G, Stanzione P, Pisani A, Maccarrone M (2010) Dynamic changes of anandamide in the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. *Mov Disord* 25:920-924.
- Przybyla JA, Watts VJ (2010) Ligand-induced regulation and localization of cannabinoid CB1 and dopamine D2L receptor heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 332:710-719.
- Putterman DB, Munhall AC, Kozell LB, Belknap JK, Johnson SW (2007) Evaluation of levodopa dose and magnitude of dopamine depletion as risk factors for levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 323:277-284.
- Raju DV, Ahern TH, Shah DJ, Wright TM, Sijm D, Hall RA, Smith Y (2008) Differential synaptic plasticity of the corticostriatal and thalamostriatal systems in an MPTP-treated monkey model of parkinsonism. *Eur J Neurosci* 27:1647-1658.
- Rall W (1962) Electrophysiology of a dendritic neuron model. *Biophys J* 2:145-167.
- Rice ME, Patel JC, Cragg SJ (2011) Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198:112-137.

- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, Soubrie P, Breliere JC, Le Fur G (1995) Biochemical and pharmacological characterization of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* 56:1941-1947.
- Rinaldi-Carmona M, Pialot F, Congy C, Redon E, Barth F, Bachy A, Breliere JC, Soubrie P, Le Fur G (1996) Characterization and distribution of binding sites for [3H]-SR 141716A, a selective brain (CB1) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain. *Life Sci* 58:1239-1247.
- Roedter A, Winkler C, Samii M, Walter GF, Brandis A, Nikkhah G (2001) Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *J Comp Neurol* 432:217-229.
- Rommelfanger KS, Wichmann T (2010) Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat* 4:139.
- Rosenblad C, Kirik D, Devaux B, Moffat B, Phillips HS, Bjorklund A (1999) Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Europ J Neurosci* 11:1554-1566.
- Russo EB (2007) History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers* 4:1614-1648.
- Rylander D, Recchia A, Mela F, Dekundy A, Danysz W, Cenci MA (2009) Pharmacological modulation of glutamate transmission in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia: effects on motor behavior and striatal nuclear signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 330:227-235.
- Sauer H, Oertel W (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59:401-416.
- Schallert T, Norton D (1992) A clinically relevant unilateral rat model of Parkinsonian akinesia. *J Neural Transpl* 3:332-333.
- Scherfler C, Schwarz J, Antonini A, Grosset D, Valldeoriola F, Marek K, Oertel W, Tolosa E, Lees AJ, Poewe W (2007) Role of DAT-SPECT in the diagnostic work up of parkinsonism. *Mov Disord* 22:1229-1238.
- Schrag A, Quinn N (2000) Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain* 123 (Pt 11):2297-2305.
- Schuster S, Doudnikoff E, Rylander D, Berthet A, Aubert I, Ittrich C, Bloch B, Cenci MA, Surmeier DJ, Hengerer B, Bezard E (2009) Antagonizing L-type Ca²⁺ channel reduces development of abnormal involuntary movement in the rat model of L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biol Psychiatry* 65:518-526.
- Schwartz R K, Huston J P (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50:275-331.
- Segovia G, Mora F, Crossman AR, Brochie J M (2003) Effects of CB1 cannabinoid receptor modulating compounds on the hyperkinesia induced by high-dose levodopa in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 18:138-149.
- Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung J, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U (2002) Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10150-10155.
- Sieradzan K, Fox S, Hill M, Dick J, Crossman A, Brochie J (2001) Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. *Neurology* 57:2108-2119.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB (2000) The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129:227-230.
- Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR (2012) Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology* 37:213-246.
- Soderstrom KE, O'Malley JA, Levine ND, Sortwell CE, Collier TJ, Steece-Collier K (2010) Impact of dendritic spine preservation in medium spiny neurons on dopamine graft efficacy and the expression of dyskinesias in parkinsonian rats. *Eur J Neurosci* 31:478-490.

- Spinnewyn B, Charnet C, Cornet S, Roubert V, Chabrier PE, Auguet M (2011) An improved model to investigate the efficacy of antidyskinetic agents in hemiparkinsonian rats. *Fundam Clin Pharmacol* 25:608-618.
- Ståhle L (1992) Do autoreceptors mediate dopamine agonist—induced yawning and suppression of exploration? A critical review. *Psychopharmacology* 106:1-13.
- Sugiura T, Waku K (2000) 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108:89-106.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97.
- Surmeier D, Bargas J, Hemmings H, Nairn A, Greengard P (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopamine receptor protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14:385-482.
- Szallasi A (2006) Small molecule vanilloid TRPV1 receptor antagonists approaching drug status: can they live up to the expectations? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 373: 273-286.
- Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Da Cunha C, Takahashi RN (2010) Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2010:238491.
- Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L, Blumberg PM (2005) Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 135:162-168.
- Tzavara ET, Li DL, Moutsimilli L, Bisogno T, Di Marzo V, Phebus LA, Nomikos GG, Giros B (2006) Endocannabinoids activate transient receptor potential vanilloid 1 receptors to reduce hyperdopaminergia-related hyperactivity: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 59:508-515.
- Ungerstedt U (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:69-93.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485-493.
- Valverde F (1970) The Golgi method. A tool for comparative structural analysis, in: Nauta, W.J.H., Ebesson, S. (Eds.), *Contemporary research methods in neuroanatomy*, Springer, New York. pp 12-28.
- van der Stelt M, Fox SH, Hill M, Crossman AR, Petrosino S, Di Marzo V, Brochie JM (2005) A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J* 19:1140-1142.
- Van Laere K, Casteels C, Lunsken S, Goffin K, Grachev ID, Bormans G, Vandenberghe W (2012) Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease in vivo. *Neurobiol Aging* 33:620 e621-628.
- Vásquez C, Lewis D (1999) The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making them unavailable to couple to other receptors. *The J Neurosci* 19:9271-9351.
- Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA (2001) Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 534:813-825.
- Venderova K, Ruzicka E, Vorisek V, Visnovsky P (2004) Survey on cannabis use in Parkinson's disease: subjective improvement of motor symptoms. *Mov Disord* 19:1102-1106.
- Walsh S, Gorman AM, Finn DP, Dowd E (2010a) The effects of cannabinoid drugs on abnormal involuntary movements in dyskinetic and non-dyskinetic 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 1363:40-48.
- Walsh S, Mich K, Mackie K, Gorman AM, Finn DP, Dowd E (2010b) Loss of cannabinoid CB1 receptor expression in the 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal terminal lesion model of Parkinson's disease in the rat. *Brain Res Bull* 81:543-548.
- Winkler C, Kirik D, Bjorklund A, Cenci MA (2002) L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 10:165-186.

- Yang J, Sadler TR, Givrad TK, Maarek JM, Holschneider DP (2007) Changes in brain functional activation during resting and locomotor states after unilateral nigrostriatal damage in rats. *Neuroimage* 36:755-773.
- Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Pinto JP, Chagas MH, Rodrigues GG, Dursun SM, Tumas V (2009) Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. *J Psychopharmacol* 23:979-983.
- Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC (2000) Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol* 427:440-454.
- Zygmunt P, Petersson J, Andersson D, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt E (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-459.