

Aumento de las concentraciones extracelulares de aminoácidos neurotransmisores y muerte celular en el núcleo pedunculopontino de ratas hemiparkinsonianas por inyección intracerebral de 6-hidroxidopamina

✉ Lisette Blanco¹, Lourdes Lorigados¹, Sandra Orozco², Luisa L Rocha², Nancy Pavón¹, María E González¹, Yosvani Bauza¹, Yosvani Coro¹

¹Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN)
Ave. 25 No 15 805 e/ 158 y 160, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: lisette.blanco@infomed.sld.cu, lblanco@neuro.ciren.cu
²CINVESTAV, Unidad Sur, México D.F., México

RESUMEN

En la última década se ha relacionado la disfunción del núcleo pedunculopontino (NPP) con la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP); sin embargo, no se conocen los cambios que experimenta la liberación de neurotransmisores en esta estructura. Estudiar los cambios en la liberación de glutamato (GLU) y de ácido γ -aminobutírico (GABA) en el NPP de ratas hemiparkinsonianas, y evaluar la muerte celular en esa estructura, es el objetivo de esta investigación. Se analizaron tres grupos de ratas Wistar: sanas (n = 12); lesionadas con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (n = 11); falsas lesionadas (n = 10). En todas las ratas se implantó una cánula de microdialísis en el NPP derecho ipsilateral a la inyección de 6-OHDA, y los dializados se analizaron por técnicas cromatográficas. La muerte celular en el NPP de los animales lesionados se evaluó por inmunohistoquímica TUNEL. Hubo un aumento significativo en las concentraciones de GLU y GABA en el NPP de las ratas hemiparkinsonianas ($p < 0.001$). Se evidenció un proceso de muerte celular en el NPP ipsilateral a la lesión del SNc. El incremento en los niveles de GLU puede estar relacionado con la hiperactividad de la «vía indirecta» de los ganglios basales (GB) y a la vez pudiera disparar mecanismos de muerte neuronal en el NPP. El aumento en la liberación de GABA puede asociarse con la hiperactividad de los núcleos diana de los GB. Estos resultados refuerzan la hipótesis de la participación del NPP en la fisiopatología de la EP.

Palabras claves: núcleo pedunculopontino, glutamato, gaba, microdialísis cerebral, muerte celular

Biotecnología Aplicada 2007;24:33-40

INVESTIGACIÓN

ABSTRACT

Increase in the extracellular concentration of amino acid neurotransmitters and cell death on the pedunculopontine nucleus of hemiparkinsonian rats upon intracerebral injection of 6-hydroxy dopamine. Although the dysfunctions of the pedunculopontine nucleus (PPN) have been linked in the last decade to the physiopathology of Parkinson's disease (PD), the changes in the patterns of neurotransmitter release of this structure remain largely unknown. This study focuses on the changes in the release of glutamate (GLU) and γ -aminobutyric acid (GABA) in the PPN of hemiparkinsonian rats, and on the evaluation of the occurrence of neuronal death in this structure. Three groups of Wistar rats were evaluated: healthy (n = 12); lesioned with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (n = 11), and falsely lesioned (n = 10). In all cases, a microdialysis catheter was implanted in the right NPP, ipsilateral to the injection of 6-OHDA, and the dialysates were analyzed by chromatographic techniques. The neuronal death was followed by TUNEL immunohistochemistry. There were statistically significant increases in the concentration of GLU and GABA for the PPN of hemiparkinsonian rats ($p < 0.001$), and processes of cell death were evidenced in the PPN ipsilateral to the SNc lesion. The higher GLU levels may be related to the hyperactivity of the "indirect pathway" of the basal ganglia (BG), and may trigger neuronal death in the PPN. The increases in the release of GABA may be associated to the hyperactivity of the target nuclei in the BG. These results reinforce the hypothesis of the involvement of the PPN in the physiopathology of PD.

Key Words: pedunculopontine nucleus, glutamate, gaba, cerebral microdialysis, cellular death

Introducción

En los últimos 20 años, muchos han sido los estudios sobre los cambios neuroquímicos que se desencadenan en los distintos núcleos de los ganglios basales, como consecuencia de la degeneración de la *substantia nigra pars compacta* (SNc) y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (EP) [1-5]. Los modelos experimentales de parkinsonismo, muy bien establecidos por inyección intracerebral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en roedores [6] y 1 metil 4 fenil 1, 2, 3, 6 tetrahidropiridina (MPTP) sistémica [7] o intracarotídea [8] en primates no humanos, han permitido dilucidar muchos de los aspectos relacionados con estos cambios [1-5]. Sin

embargo, mientras los estudios encaminados a obtener información sobre el funcionamiento de los núcleos que conforman los ganglios basales han aumentado, otros núcleos como el pedunculopontino (NPP), fuera de los ganglios basales pero muy relacionados con estos, no se han estudiado en la misma magnitud [9-11].

Se sabe que el NPP está conectado con diferentes núcleos que forman parte de los ganglios basales; entre ellos: el núcleo subtalámico (NST), la SNc y los núcleos de salida de información (el segmento interno del *globus pallidus* (Gpi) y la *substantia nigra pars reticulata* (SNr) (Figura 1) [12-14]. Al mismo tiempo, el NPP

1. Meshul CK, Emre N, Nakamura CM, Allen C, Donue MK, Buckman JF. Time-Dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-OHDA lesion. *Neuroscience* 1999;88(1):1-16.

2. Reynolds NC, Lin W, Cameron CM, Roering DL. Extracellular perfusion of rat brain nuclei using microdialysis methods for studying differential neurotransmitter release in response to neurotoxins. *Brain Research Protocols* 1999;4:124-31.

3. Carvalho G, Nikkhhah G. Subthalamic Nucleus Lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-Induced Striatal Lesions and Restore Postural Balancing Reactions. *Exp Neurol* 2001;171:405-17.

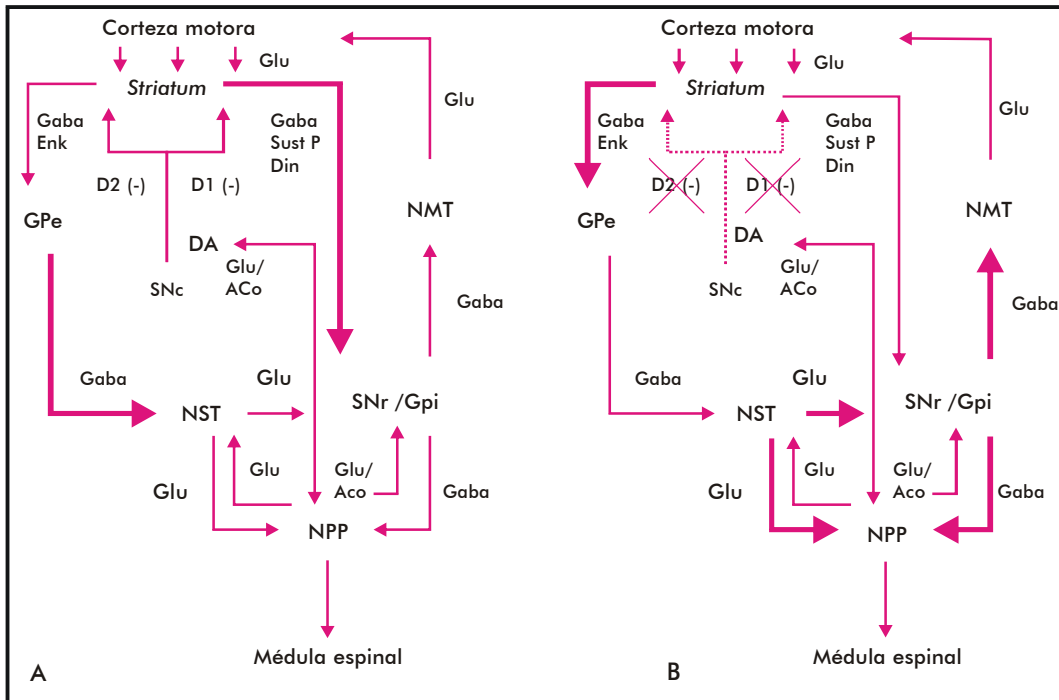


Figura 1. Diagrama del funcionamiento del circuito motor de los ganglios basales. A. Condición sana. La dopamina ejerce un efecto facilitador de la transmisión a través de la «vía directa» estriato nigral y mediada por el receptor dopaminérgico D1 y un efecto inhibitorio de la transmisión a través de la «vía indirecta» mediada por el receptor D2. B. Condición parkinsoniana. Se pierde el efecto de la dopamina con un incremento de la transmisión a través de la «vía indirecta» y una disminución de la transmisión a través de la «vía directa» del circuito motor.

Leyenda:

Glu: glutamato, GABA: ácido γ -aminobutírico, DA: dopamina, ACo: acetilcolina, Enc: encefalinas, Sust P: Sustancia P, Din: dinorfinas, Gpe: *Globus pallidum externo*, NST: núcleo subtalámico, Gpi: *Globus pallidum interno*, SNr: *substantia nigra pars reticulata*, SNC: *substantia nigra pars compacta*, NPP: núcleo pedunculopontino, NMT: núcleos motores del tálamo. Las flechas más gruesas representan la facilitación o el aumento de la transmisión. Las líneas finas representan la disminución de la transmisión. Las líneas discontinuas representan la degeneración de la vía nigrostriatal.

envía una proyección a través del haz reticuloespinal medial hacia las interneuronas de la médula espinal y participa en el control de la musculatura axial [15].

Algunos trabajos en la última década señalan al NPP como una estructura que se debe tener en cuenta en la fisiopatología del parkinsonismo, a partir de tres elementos fundamentales: su localización en el área locomotora mesencefálica, su participación en el control de la postura y de la marcha, y sus relaciones anatómicas y funcionales con los ganglios basales [10-11].

Los cambios encontrados en el funcionamiento del NPP en modelos experimentales de EP en roedores y primates, han enfatizado la importancia de esta estructura en el procesamiento de la información motora [11, 16, 17]. En modelos de hemiparkinsonismo en ratas se ha descrito un aumento de la actividad eléctrica de las células del NPP, el cual se normaliza después de la lesión excitotóxica del NST [18]. Otros autores señalan el efecto de la inyección de fármacos antagonistas gabaérgicos en el NPP, en la reversión de la acinesia, que caracteriza a los primates parkinsonianos [19]. Este mismo grupo [19] publicó la mejora motora significativa mostrada por primates parkinsonianos sometidos a estimulación eléctrica del NPP, y recientemente ha señalado la posibilidad de evaluar esto como un nuevo blanco para mejorar la acinesia de los pacientes parkinsonianos por estimulación eléctrica profunda [20].

La técnica de microdiálisis cerebral se ha utilizado para estudiar la liberación de neurotransmisores en distintas estructuras del sistema nervioso central [21-24]. La posibilidad de obtener información sobre la composición del medio extracelular de un núcleo determinado *in vivo*, hacen de esta técnica una herramienta esencial en los estudios neuroquímicos de los últimos diez años [25].

A pesar de los avances en el desarrollo de esta técnica, el estudio de la liberación de aminoácidos neurotransmisores (glutamato, GLU, y ácido γ aminobutírico, GABA) en el NPP en los modelos de parkinsonismo, es un tema poco abordado en la literatura [26]. Ello se debe a dos razones esenciales: se ha enfocado el estudio de la neurotransmisión dopaminérgica en otros núcleos, como la SNC, por ser este el sistema de neurotransmisión principalmente involucrado en la disfunción motora que caracteriza a la EP; mientras que se conoce la deficiencia dopaminérgica asociada al parkinsonismo desde la década de 1960, apenas en los últimos diez años, se ha comenzado a considerar al NPP como una estructura clave en la fisiopatología de la EP.

A pesar de los progresos publicados tras el estudio de la actividad eléctrica de las células pontinas y sus modificaciones en modelos experimentales de parkinsonismo, existe poca información disponible sobre la liberación de neurotransmisores en el NPP,

4. Zigmond MJ, Hastings TG, Pérez RG. Increased dopamine turnover after partial loss of dopaminergic neurons: compensation or toxicity? *Parkinsonism and Related Disorders* 2002;8:389-93.

5. Hallett PJ, Y Standaert DG. Rationale for and use of NMDA receptor antagonist in Parkinson's disease. *Pharmacology Therapy* 2004;102(2):155-74.

6. Ungerstend U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-OHDA lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 1970;24:485-93.

7. Kopin IJ, Schoenberg DG. MPTP in Animal Models of Parkinson's Disease. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 1988; 55(1):43-9.

8. Jenner P. The contribution of the MPTP-treated primate model to the development of new strategies for Parkinson's Disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2003;9:131-7.

9. Parent A, Côté PY, Lavoie B. Chemical anatomy of primate basal ganglia. *Progress in Neurobiology* 1995;46:131-97.

10. Erro E, Giménez-Amaya J. Pedunculopontine tegmental nucleus: Anatomy, functional considerations and pathophysiological implications. *Anales Sistema Sanitario Pamplona* 1999;22(2):189-201.

así como el efecto de la lesión neurotóxica de la SNc sobre la posible ocurrencia de eventos de muerte celular en este núcleo.

El propósito de la presente investigación fue estudiar la liberación de GLU y GABA en el NPP de ratas hemiparkinsonianas, así como evaluar la posible ocurrencia de muerte celular en las células pontinas ipsilaterales tras la inyección de 6-OHDA.

Sujetos experimentales

El estudio se realizó con ratas Wistar, machos adultos, cuyo peso osciló entre 200 y 250 g, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Durante el experimento se mantuvieron tres animales por caja, con ciclos de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad y acceso libre al agua y a los alimentos. Todo el trabajo experimental se realizó teniendo en cuenta la *Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales de experimentación* (...) [27].

Materiales y métodos

Lesión de la SNc

Las ratas se anestesiaron por la administración intraperitoneal (i.p.) de una solución de hidrato de cloral (420 mg/kg de peso) y se colocaron en un equipo de cirugía estereotáctica para roedores (Stoelting, EE.UU.). Se les inyectó 3 µL de una solución de 6-OHDA (St. Louis, EE.UU., 8 µg/3 µL de solución salina fisiológica al 0.9% + 0.5 mg/mL de ácido ascórbico), a razón de 1 µL/min en la SNc derecha, utilizando las siguientes coordenadas estereotácticas (mm), de acuerdo con el *Atlas de Paxinos y Watson* [28]: AP = -0.49, L = 0.17, DV = 0.81.

Actividad rotatoria

Un mes después de la lesión de la SNc, se estudió la actividad rotatoria inducida por d-anfetamina (5 mg/kg de peso, por vía i.p.). Esta variable se evaluó durante 90 min, mediante un multicontador electrónico acoplado a sensores (LE 3806, PanLab, Barcelona, España) que determinaban el sentido de giro. En el estudio solo se incluyeron los animales que mostraron no menos de siete giros por minuto, lo que corresponde a una deservación dopaminérgica igual o superior al 90%, (datos no mostrados) [29]. La administración de solución salina fisiológica (NaCl) al 0.9%, con el mismo volumen y coordenadas, permitió conformar un grupo control falso lesionado.

Se organizaron tres grupos experimentales: ratas sanas (n = 12), ratas con lesión de la SNc (n = 11), ratas falso lesionadas en la SNc (n = 10).

Cánulas de microdiálisis

Se construyeron cánulas de microdiálisis de tipo concéntrico, de acuerdo con lo descrito en la bibliografía [30]. Se utilizó un segmento de 1 mm de membrana de diálisis de poliacrilonitrilo, cuyo poro de corte es de 41 000 Da (Hospal Industrie Meyzie, Francia). Se determinó el recobrado *in vitro* de las cánulas de microdiálisis a temperatura ambiente y se utilizó una concentración conocida de los aminoácidos de interés.

Microdiálisis *in vivo*

La cirugía de implante de la cánula guía se realizó un mes después de la inyección de 6-OHDA en la SNc. Utilizando técnicas estereotácticas estándares, se cementó al cráneo una cánula guía de acero inoxidable en las coordenadas (mm) correspondientes al NPP derecho, ipsilateral a la lesión de la SNc: AP = -8.00, L = 1.90, DV = 6.82 (esta última ajustada a la cánula de microdiálisis cerebral).

A los animales se les permitió recuperarse, y tres días después del implante de la cánula guía, se introdujo en ella una cánula de microdiálisis, después de retirar el estilete que protege el orificio de la cánula guía. Todos los experimentos se realizaron con las ratas despiertas.

Las cánulas de microdiálisis se conectaron a un sistema de bomba de infusión (CMA 100; CMA Microdialysis, Estocolmo, Suecia), y se perfundieron continuamente con una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) preparado en el laboratorio (125 mmol de NaCl, 2.5 mmol de KCl, 0.5 mmol de NaH₂PO₄, 5 mmol de Na₂HPO₄, 1 mmol de MgCl₂, 6H₂O, 1.2 mmol de CaCl₂, 1.2 mmol de ácido ascórbico, pH 7.4 -7.6) a una tasa de 2 µL/min. Después de 2 h de estabilización del sistema, se tomaron las muestras de forma manual cada 20 min.

Se colectaron seis dializados en cada rata, que fueron inmediatamente conservados a -80 °C hasta su posterior análisis.

Análisis de los aminoácidos

Las concentraciones de aminoácidos en los dializados se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*), acoplada a un detector de fluorescencia y empleando derivatización con OPA.

Se mezclaron 10 µL de muestra con 10 µL del agente derivatizante (10 mmol de OPA, disueltos en una solución tampón de tetraborato de sodio 0.1 M, que contenía 77 mmol de ácido 3-mercaptopropiónico y metanol al 10% a pH 9.3). La mezcla se agitó en un agitador durante 15 s, y la reacción se detuvo con ácido acético al 5% a los 45 s. De esta mezcla se inyectaron 20 µL al cromatógrafo con una jeringuilla Hamilton. Los aminoácidos derivatizados se hicieron pasar por una columna de fase inversa (HR-80, de 8 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, ESA), con una precolumna de fase estacionaria similar, mediante una bomba cromatográfica isocrática (Knauer K1001), y se detectaron mediante un detector de fluorescencia con 340 λ de excitación y 460 λ de emisión (Philips PU 4027). El registro de los cromatogramas se realizó mediante el programa CHROMATEPC, versión 4.24 (Philips). Para la separación de los aminoácidos se utilizó una fase móvil, compuesta por NaH₂PO₄ 0.1 M y metanol al 20%. Cada muestra se analizó por duplicado.

Estudio morfológico

Obtención del tejido: los animales se anestesiaron con hidrato de cloral (480 mg/kg de peso, por vía i.p.), y luego se perfundieron a través de la arteria aorta ascendente. Se extrajeron sus cerebros y se fijaron en formalina al 10% durante 24 h. Seguidamente, se obtuvieron cortes coronales (20 µM) (Criostato Leitz

11. Lee MS, Rinne JO, Marsden D. The Pedunculopontine Nucleus: Its Role in the genesis of Movement Disorders. *Yonsei Medical Journal* 2000;41(2):167-84.

12. Pahapill P, Lozano A. The pedunculopontine nucleus and Parkinson's Disease. *Brain* 2000;123:1767-83.

13. Mena-Segovia J, Bolam JP, Magill PJ. Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *TINS* 2004;27(10):585-8.

14. Nakano K, Kayahara T, Ushiro H, Hasegawa Y. Some Aspects of Basal Ganglia-Thalamocortical Circuitry and Descending Outputs of the Basal Ganglia. In: Segawa M, Nomura Y (eds.). *Age-Related Dopamine Dependent Disorders*. Paris, London, New York: Ed. Karger, Basel 1995;134-46.

15. Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Macías R, Álvarez L, Guridi J, Vitek J, DeLong M. Pathophysiological basis of surgery for Parkinson's Disease. *Neurology* 2000;55(12):7-12.

16. Jeon MF, Yoon H, Hee-Cho Y, Lee B, Park G, Woo-Chang J. Effect of ipsilateral subthalamic nucleus lesioning in a rat parkinsonian model: study of behavior correlated with neuronal activity in the PPN. *J Neurosurg* 2003;99:762-7.

17. Jenkinson N, Nandi D, Miall RC, Stein JF, Aziz TZ. Pedunculopontine nucleus stimulation improves akinesia in a Parkinsonian monkey. *Neuroreport* 2004;15(17):2621-4.

18. Breit S, Benazzouz-Bouali R, Benabid AL, Benazzouz A. Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway induces an increase of neuronal activity of the pedunculopontine nucleus, which is reversed by the lesion of the subthalamic nucleus. *Eur J Neuroscience* 2001;14:1833-42.

19. Nandi D, Aziz T, Giladi N, Winter J, Stein J. Reversal of akinesia in experimental Parkinsonism by GABA antagonist micro-injections in the pedunculopontine nucleus. *Brain* 2002;125:2418-30.

20. Jenkinson N, Nandi D, Aziz TZ, Stein JF. Pedunculopontine nucleus: a new target for deep brain stimulation for akinesia. *Neuroreport* 2005;16(17):1875-6.

21. Sarre S, Herregodts P, Deleu D, Devrieze A, De Klippel N, Ebinger G, Michotte Y. Biotransformation of L-DOPA in striatum and substantia nigra of rats with a unilateral, nigrostriatal lesion: a microdialysis study. *Archives of Pharmacology* 1992;346:277-85

22. Fattori M, Bianchi L, Colivicchi MA, Chechi M, Bolam JP, Della-Corte L. The evoked release of GABA and taurine from the striatopallidum (indirect) pathway: a dual probe microdialysis study in the freely moving rat. *British J Pharmacology* 2001;133:173-9.

23. Forster GL, Blaha Ch D. Pedunculopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur J Neuroscience* 2003;17:751-62.

24. Fusch H, Hauber W. Reverse microdialysis of ionotropic receptor agonists in the rat globus pallidus increased extracellular dopamine. *Neuroscience Letters* 2003;243:37-40.

1720, Alemania) de las áreas correspondientes a la SNc y al NPP. Las secciones se montaron en láminas gelificadas, y posteriormente se añadió una tinción de violeta de cresilo para comprobar la localización correcta de la cánula de microdialísis cerebral en el NPP.

Para determinar la extensión de la degeneración dopaminérgica nigral, se examinaron los cortes coronales de la SNc con inmunohistoquímica para la enzima tirosina hidroxilasa (TH), de acuerdo con lo descrito en la literatura [31].

Método de detección de muerte celular *in situ* (TUNEL)

Obtención y preparación del tejido: los animales con lesión de la SNc se anestesiaron con hidrato de cloral (480 mg/kg de peso, por vía i.p.) y se sacrificaron por decapitación. Inmediatamente, se los cerebros extraídos se sumergieron en una solución salina fisiológica 0.9% a 4 °C, y luego se fijaron en una solución de fosfato (SBF, 0.1M, pH 7.4), que contenía 4% de paraformaldehído y 2% de glutaraldehído, durante dos días a 4 °C. A continuación se sumergieron en soluciones crecientes de sacarosa (15%, 20%, 25%, 30%) durante 2 h, y 24 h la solución de 30%. Se obtuvieron cortes coronales (10 µM) (Criostato Leitz 1720, Alemania) del NPP y las secciones se colocaron en láminas que se conservaron a 4 °C.

La fragmentación del ADN fue detectada *in situ* mediante un kit que contiene deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), según la descripción del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). Al inicio, se incubó con una solución permeabilizadora (0.1% de Triton x 100, 0.1% de citrato de sodio) durante 2 min a 4 °C. Seguidamente, se lavó con una solución tampón de fosfato y se adicionó la mezcla de la solución TUNEL. Las secciones se incubaron durante 60 min a 37 °C y se lavaron tres veces con la solución tampón de fosfato. A continuación, se adicionó un anticuerpo de carnero fluoresceinado, conjugado con fosfatasa alcalina (Roche Molecular Biochemical, Alemania), durante 30 min a 37 °C, se lavó y se añadió el sustrato por 10 min a temperatura ambiente.

Las secciones se tiñeron con yoduro de propidio (Sigma, EE.UU.) durante 2 min, y finalmente se cubrieron con medio de montaje Vectashield con DAPI (1.5 µg/mL de DAPI, Vector Lab., CA, EE.UU.). Las láminas se examinaron en un microscopio de fluorescencia (excitación entre 560 y 500 nm, y detección entre 515 y 565 nm, Leitz, Alemania) y en un microscopio confocal Leica 2B [32].

Análisis de los datos

Se realizó la prueba de normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas de estos, por medio de la prueba de Kolmogorov Smirnov y la prueba de Bartlett, respectivamente. La comparación de la liberación de GLU y de GABA en el NPP entre los grupos experimentales, se realizó mediante un análisis de varianza de clasificación simple, seguido de una prueba de Tukey. Se trabajó con un nivel de significación de 0.05. Los datos se procesaron con el programa profesional de computación Estadística, versión 6.1.

Resultados

Liberación de GLU y de GABA en el NPP

La comparación de la liberación de GLU en el NPP reveló diferencias entre los grupos experimentales ($F_{(2, 33)} = 23.57$ $p < 0.001$), hubo un incremento significativo de las concentraciones extracelulares de este neurotransmisor en las ratas con lesión de la SNc (Figura 2A). De igual forma, la comparación de la liberación de GABA mostró un aumento significativo en el NPP de las ratas con lesión de la SNc ($F_{(2, 31)} = 26.51$ $p < 0.01$) (Figura 2B).

Estudios morfológicos e inmunohistoquímico

El estudio morfológico reveló una adecuada localización de la cánula de microdialísis cerebral en las coordenadas correspondientes al NPP, el cual se ubica en la parte distal del pedúnculo cerebeloso superior (Figura 3).

El estudio de la fragmentación del ADN celular (TUNEL) no mostró células TUNEL+ en el NPP izquierdo contralateral a la inyección de la 6-OHDA en la SNc (Figuras 4A-4C). Este resultado contrasta con la presencia de células TUNEL+ en el NPP derecho, lo cual representa la ocurrencia de un proceso de muerte en las células pontinas ipsilaterales a la lesión de la SNc (Figuras 4D-4F).

En el NPP izquierdo contralateral a la inyección de 6-OHDA, se observaron células DAPI+, pero ninguna mostró inmunorreactividad a TUNEL (Figura 5A). En el caso del NPP derecho ipsilateral a la lesión, escasamente se observó la dualidad de ambos marcadores (DAPI + TUNEL), lo cual es indicativo de que la muerte celular por mecanismos apoptóticos es muy escasa (Figura 5B).

Discusión

Los resultados de este trabajo constituyen una evidencia de los cambios que experimenta la liberación de GLU y de GABA en el NPP de ratas hemiparkinsonianas, así como la primera descripción de muerte celular pontina en este modelo experimental.

25. Bianchi L, Galeffi F, Bolam JP, Corte D. The effect of 6-OHDA lesions on the release of aminoacids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. Eur J Neuroscience 2003;18:856-68.

26. Steiniger B, Kretschmer B. Glutamate and Gaba modulate dopamine in the pedunculopontine tegmental nucleus. Exp Brain Res 2003;149:422-30.

27. Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales de experimentación en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio; Ed 02-2000:100.

28. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York 1998.

29. Zigmund M, Stachowiak M, Berger T, Stricker E. Neurochemical events underlying continued function despite injury to monoaminergic systems. Exp Brain Res 1986;13:119-28.

30. Robinson TE, Camp DM. The feasibility of repeated microdialysis for within-subjects design experiments: studies on the mesostriatal dopamine system. In: Houston JP, Robinson TE, Justice JB (eds.). Techniques in the behavioral and neural sciences. Amsterdam, London, New York Ed: Elsevier 1991:449.

31. Blanco L, Pavón N, Macías R, Castillo L, Díaz C, García A, Álvarez P. Microtrasplante simultáneo de células mesencefálicas fetales en striatum y SNr de ratas hemiparkinsonianas. Estudio Conductual. Revista de Neurología 2000;30(12):1122-7.

32. Caerr FR. Apoptosis: It's significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994;73:2013-26.

33. Zweig RM, Jankel WR, Hedreen JC. The Pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease. Annals Neurology 1989;26:41-6.

34. Semba K, Fibiger H. Afferent Connections of the Laterodorsal and the Pedunculopontine Tegmental Nuclei in the Rat: A Retro and Antero Grade Transport and Immunohistochemical Study. J Comparative Neurol 1992;323:387-410.

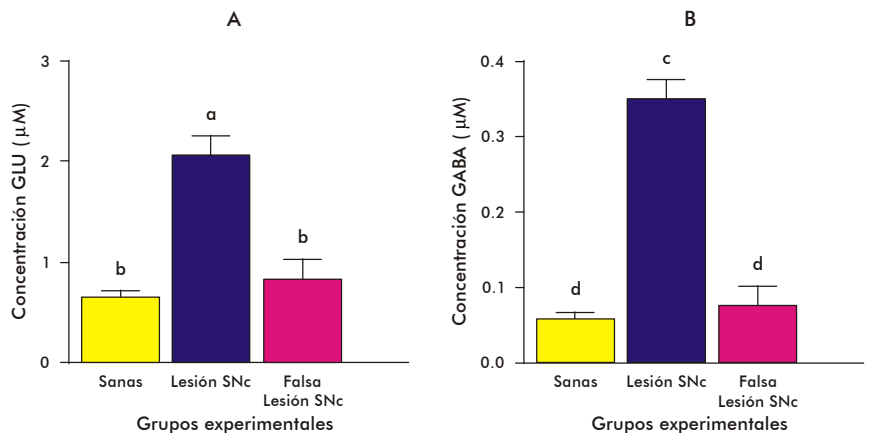


Figura 2. Liberación de glutamato y GABA en el NPP de ratas sanas, hemiparkinsonianas y falso operadas. A. Comparación de la liberación de glutamato entre grupos. B. Comparación de la liberación de GABA entre grupos. La comparación entre los grupos se realizó mediante un análisis de varianza de clasificación simple, seguido por una prueba de Tukey. Las letras desiguales sobre las barras indican las diferencias estadísticamente significativas: a vs b ($p < 0.001$) y c vs d ($p < 0.01$).

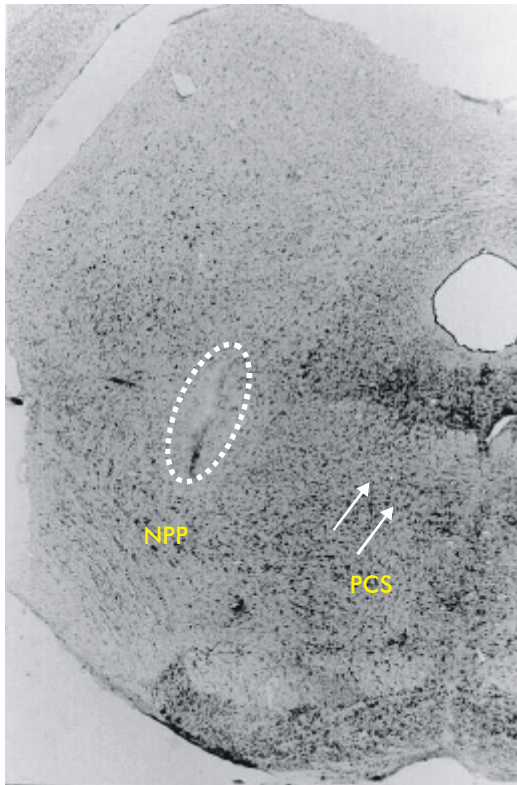


Figura 3. Microfotografía representativa de una sección coronal teñida con violeta de crisol, que ilustra el sitio en el que se ubica la cánula de microdialísis cerebral (5x). El área delimitada con puntos discontinuos corresponde a la huella de la cánula en el tejido, justo en la parte distal del pedúnculo cerebeloso superior.
 Leyenda:
 NPP: núcleo pedunculopontino, PCS: pedúnculo cerebeloso superior.

Efecto de la lesión de la SNc en las concentraciones extracelulares de GLU y de GABA en el NPP

La mayor parte de los estudios clínicos y experimentales que intentan explicar los trastornos motores relacionados con el síndrome parkinsoniano, han prestado especial atención al clásico lazo: corteza motora-*striatum-globus pallidus*-tálamo-corteza motora, mientras que las proyecciones desde los ganglios basales hasta los núcleos pontinos y de estos a la médula espinal han sido relativamente poco estudiadas (Figura 5A) [33-35].

El incremento significativo de la liberación de GLU en el NPP de las ratas hemiparkinsonianas, concuerda con las evidencias de que la neurotransmisión glutamatérgica en los ganglios basales se modifica significativamente en el estatus parkinsoniano [36]. La muerte de las células dopaminérgicas se acompaña de una pérdida del control inhibitorio que ejerce la dopamina a través de su subtipo de receptor D2 sobre la "vía indirecta" del circuito motor de los ganglios basales [37]. Como consecuencia, se produce un aumento de la transmisión mediante esta vía, que involucra al NST, cuyas células expresan GLU como neurotransmisor [38] (Figura 1B).

El aumento de la liberación de GLU en el NPP puede contribuir a perpetuar la hiperactividad subtalámica,

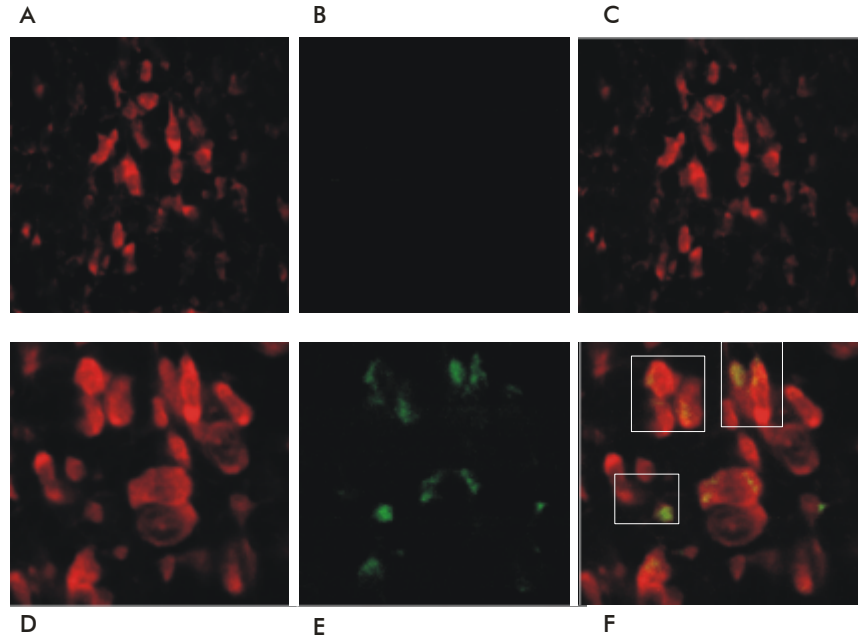


Figura 4. Microfotografía tomada con microscopia confocal, representativa del estudio inmunohistoquímico, para el proceso de muerte celular en secciones coronales del NPP de las ratas con lesión de la SNc por inyección de 6-OHDA. (A-C 40x) A. Tinción de iodo de propidio en secciones coronales de NPP izquierdo contralateral a la lesión de la SNc. B. Células TUNEL-negativas en el NPP izquierdo contralateral a lesión de la SNc. C. Doble marcaje de iodo de propidio + TUNEL muestra los núcleos celulares sin evidencia de proceso de muerte celular en el NPP izquierdo. (D-F 40x2) D. Tinción de iodo de propidio en secciones coronales del NPP derecho ipsilateral a la lesión de la SNc. E. Células TUNEL-positivas en secciones coronales del NPP derecho. F. Doble marcaje de iodo de propidio + TUNEL en secciones coronales de NPP derecho. Los rectángulos de puntos discontinuos señalan cuerpos celulares en procesos de muerte celular.

pues se conoce que ambas estructuras, NST y NPP, están conectadas en un lazo monosináptico y proyectan a los núcleos de salida de información: SNr y segmento interno del GP [34, 39, 40]. El incremento significativo en la expresión del ARNm, que codifica para la subunidad I de la citocromo oxidasa en las neuronas pontinas que proyectan al NST en ratas parkinsonianas, apunta hacia la participación del NPP en la hiperactividad subtalámica [41].

Este aumento significativo de GLU en el espacio extracelular del NPP puede ser un elemento clave en el propio funcionamiento del núcleo en condiciones de parkinsonismo, y al mismo tiempo, pudiera realizar una función fundamental en la estimulación de las células dopaminérgicas que sobreviven a la lesión neurotóxica. La SNc recibe proyecciones de naturaleza colinérgica y glutamatérgica procedentes del NPP, y tanto la acetil colina (ACo) como el GLU modulan la actividad de las células nigrales [42].

Estudios recientes revelaron que en las ratas parkinsonianas ocurre un incremento significativo de la liberación de GLU en otras estructuras que, al igual que el NPP, reciben aferencias glutamatérgicas procedentes del NST; tal es el caso del GP y la SNr [43, 44].

El incremento en la liberación de GABA en el NPP de las ratas hemiparkinsonianas observado en este estudio, puede explicarse por la hiperactividad de la SNr y el Gpi. Las neuronas glutamatérgicas de la *pars dissipata* del NPP de las ratas reciben una proyección gabaérgica procedente de estos núcleos, cuya

35. Bevan MB, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson Ch J. Move to the rhythm: oscillations in the Subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *TINS* 2002;26:1-7.

36. Hamani C, Saint-Cyr JA, Fraser J, Kaplit M, Lozano A. The subthalamic nucleus in the context of movement disorders. *Brain* 2003;7:1-17.

37. Gerfen Ch. Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *TINS* 2000;23(10):21-7.

38. García Rill E. The Pedunculopontine Nucleus. *Progress in Neurobiology* 1991; 36:363-89.

39. Bevan MD, Bolam JP. Cholinergic, Gabaergic and Glutamate-Enriched Inputs from the Mesopontine Tegmentum to the Subthalamic Nucleus in the Rat. *J Neuroscience* 1995;15(11):7105-20.

40. Heise C, Mitrofanis J. Evidence for a glutamatergic Projection from the Zona Incerta to the Basal Ganglia of Rats. *J Comparative Neurol* 2004;468:482-95.

41. Orieux G, Francois C, Féger J, Yelnik J, Vila M, Ruberg M, Agid Y, Hirsch E. Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunculopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's Disease. *Neuroscience* 2000;97(1):79-88.

42. Breit S, Lessman L, Benazzouz A, Schulz JB. Unilateral lesion of the pedunculopontine nucleus induces hyperactivity in the subthalamic nucleus and substantia nigra in the rat. *J of Neurosciences* 2005;22:2283-94.

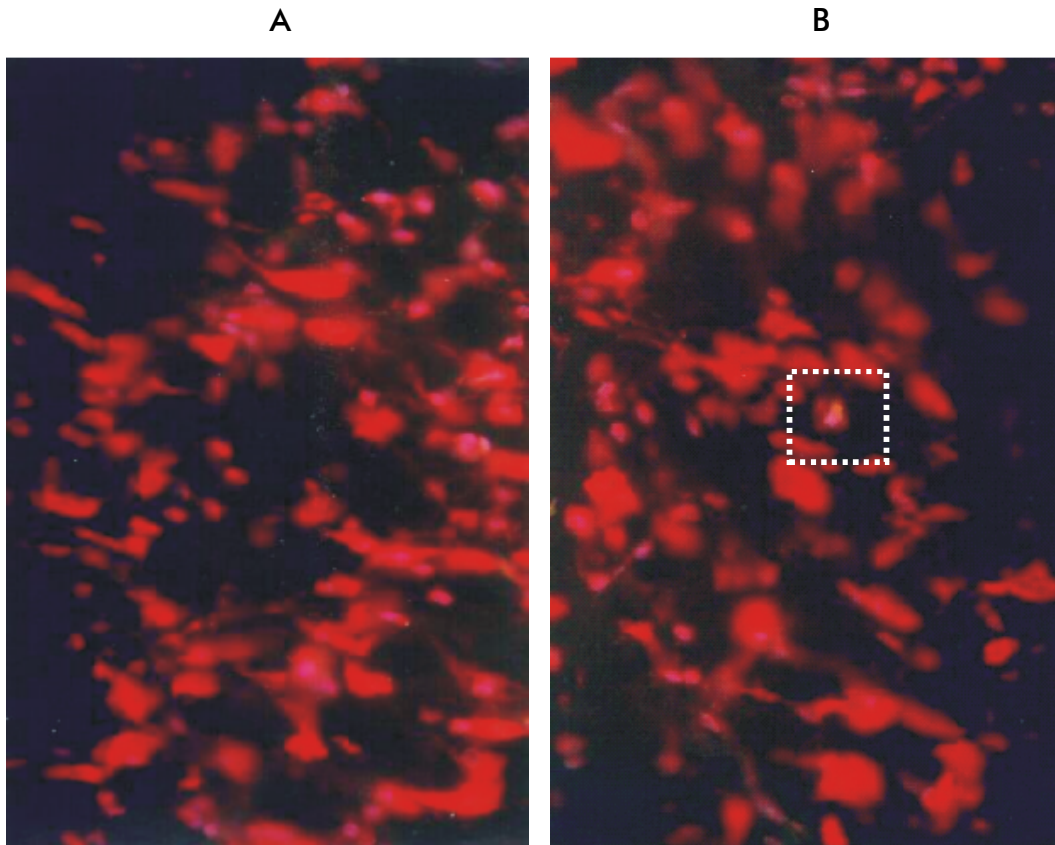


Figura 5. Microfotografía (40x) representativa de una sección coronal de NPP. Se muestran los resultados del estudio inmunohistoquímico para TUNEL y DAPI. A. NPP del hemisferio izquierdo no lesionado. B. NPP del hemisferio derecho ipsilateral a la lesión de la SNc, donde se señala una célula con marcaje positivo para DAPI y TUNEL, indicativo de muerte apoptótica. Nótese que esta doble tinción es evidente solo en células muy escasas.

hiperactividad constituye un rasgo distintivo de los cambios que se establecen en los sistemas de neurotransmisores en el parkinsonismo [11, 45-47].

Si bien el incremento de la actividad de las células pontinas, a expensas del aumento de la liberación de GLU de origen subtalámico, pudiera desempeñar una función positiva al estimular a las células dopaminérgicas que sobreviven a la lesión, este mismo aumento pudiera perpetuar la hiperactividad del complejo GP/SNr, cuyas descargas gabaérgicas inhibitorias subrayan signos como la hipocinesia y la bradicinesia que caracterizan a la EP [48]. El NPP estimula a las células gabaérgicas de la SNr, por medio de receptores colinérgicos nicotínicos y a las células dopaminérgicas de la SNc, mediante receptores a aminoácidos excitatorios, como el glutamato, y colinérgicos, que pueden ser nicotínicos y muscarínicos [37]. En este contexto, la retroalimentación gabaérgica sobre el propio NPP pudiera contribuir a atenuar este efecto.

Proceso de muerte celular en el NPP de las ratas hemiparkinsonianas

Algunos estudios han documentado la pérdida del 40 y hasta del 50% aproximadamente de las células colinérgicas de la parte lateral del NPP, así como una fuerte correlación entre la muerte de células dopaminérgicas de la SNc y la de células presumiblemente colinérgicas en el NPP de sujetos

parkinsonianos fallecidos [33, 49]. Este hallazgo sugiere que ambos grupos celulares pudieran sufrir el mismo tipo de proceso destructivo, lo cual no se ha confirmado hasta el momento [50].

El tema de la muerte celular en el NPP ha sido menos abordado en los modelos experimentales de EP. Un grupo de autores publicó que la morfología, la distribución y el número de células colinérgicas en el NPP de primates y de ratas hemiparkinsonianas no difirió de los correspondientes controles, aunque no descartaron que otros tipos celulares, como las neuronas glutamatérgicas, puedan mostrar procesos de muerte celular [51].

Los resultados del presente estudio apuntan tras la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en ratas, en el NPP ipsilateral se presentan signos de muerte celular. Sin embargo, la técnica inmunohistoquímica TUNEL no permite discriminar entre neuronas y glía, ni entre células colinérgicas o glutamatérgicas, ambas presentes en el NPP. La mencionada técnica se basa en la capacidad que poseen los extremos del ADN hidrolizados por las endonucleasas, de unirse a una cadena de dioxigenina dUTP [52].

En la literatura se sugiere que muchos modelos experimentales de daño celular conducen a la muerte por apoptosis o por necrosis con morfologías intermedias. De modo que la habilidad de la célula para ejecutar su programa de muerte puede ser modificado por daño a las

43. Hirsch E, Perier C, Orioux G, Francois C, Feger J, Yelnik J, Vila M, Levi R, Tolosa ES, Marin C, Herrero T, Obeso JA, Agid Y. Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. *TINS* 2000;23(10):78-82.

44. Savasta M, Windels F, Bruet N, Bertrand A, Poupard A. Neurochemical modifications induced by high frequency stimulation of subthalamic nucleus in rats. In: Nicholson L (ed.). *The Basal Ganglia VII* nueva York Ed.: Kluwer Academic Plenum Publisher; 2002: 581-90.

45. Mitchell IJ, Jackson A, Sambrook MA, Crossman AR. Common neural mechanism in experimental chorea and hemiballismus in the monkey. Evidences from 2-deoxyglucose autoradiography. *Brain Res* 1985; 339:346-50.

46. Grofova I, Zhiou M. Nigral innervation of cholinergic and glutamatergic cells in the rat mesopontine tegmentum: light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol* 1998;395:359-79.

47. Rodríguez M, Abdala P, Obeso JA. Excitatory Responses in the «Direct» Striatonigral Pathway: Effect of Nigrostriatal Lesion. *Movement Disorder* 2000; 15(5):795-803.

48. Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's Disease. *TINS* 2000;23(10):3-18.

células vecinas, pérdida de heterofagocitosis efectiva o un daño celular impuesto, que conduce a una falla energética y a la interrupción de las etapas de la muerte celular programada, con promoción de las cascadas necróticas correspondientes [53]. En este sentido, se ha señalado que la muerte celular se produce en un curso continuo apoptosis-necrosis, con formas celulares en las que coexisten características que son comunes a ambos procesos, y la inmunohistoquímica TUNEL no permite discriminar exactamente entre ellos [54].

En relación con este nuestro hallazgo, cabría la pregunta: ¿cuál o cuáles de los factores siguientes, por separado o de manera concomitante, pudieran convertirse en elemento disparador del mecanismo de muerte celular en esta estructura: el desequilibrio neuroquímico matizado por un aumento significativo del tono glutamatergico, la pérdida de la innervación dopaminérgica procedente de la SNc o las modificaciones en los estados de fosforilación de los receptores, asociadas a los propios cambios en los sistemas de neurotransmisores? Posiblemente cada uno de estos elementos aporte señales importantes que, en conjunto, pudieran convertirse en eventos disparadores de muerte neuronal.

El incremento del tono glutamatergico, representado en este estudio por un aumento de la liberación de GLU en la vecindad del NPP, se ha asociado al incremento de las concentraciones intracelulares de calcio, más allá de las posibilidades que ofrecen los mecanismos homeostáticos que mantienen estas concentraciones en valores constantes (100 nM) [55, 56].

El GLU se elimina de la hendidura sináptica y del espacio extracelular por medio de una proteína transportadora de aminoácidos con alta afinidad para los ácidos monocarboxílicos y dependiente de Na⁺, localizada en ambas neuronas, presináptica y postsináptica, así como en las células de la glía [57, 58]. La captura eficiente del GLU contribuye a finalizar su acción en la hendidura sináptica, ya que no se conoce ninguna enzima que lo degrade [59].

La excitación mediada por un incremento de la actividad glutamatergica, frecuentemente referida como excitotoxicidad, se considera un factor común a diferentes enfermedades neurológicas, tales como la epilepsia, las enfermedades neurodegenerativas, el daño isquémico y los efectos derivados de la exposición a toxinas ambientales [57, 60].

La literatura refiere mecanismos excitotóxicos rápidos y lentos [61]. Los mecanismos rápidos contemplan una activación excesiva de los receptores glutamatergicos N-metil D-aspartato (NMDA) y no NMDA, con la subsecuente entrada masiva de sodio y calcio a las células por medio de los canales iónicos activados por el propio glutamato [62]. El incremento de las concentraciones intracelulares de calcio se potencia por la salida de calcio de los organelos que sirven como almacenes intracelulares de este ión, como el retículo endoplasmático [62, 64]. En estas condiciones se activan varias enzimas como las proteasas, las fosfolipasas y las endonucleasas dependientes de calcio, que se ocupan de degradar sustratos como las proteínas del citoesqueleto de la neurona, los fosfolípidos de membrana y el material genético, respectivamente [65]. La excitotoxicidad lenta se produce cuando las células no son capaces de

mantener su potencial de membrana en reposo, lo cual lleva a liberar el bloqueo que fisiológicamente mantiene el ión Mg²⁺ sobre la actividad del receptor NMDA [61]. En estas condiciones, las concentraciones fisiológicas de GLU en la hendidura sináptica son suficientes para activar los receptores glutamatergicos NMDA [66].

Otros eventos relacionados con el incremento de radicales libres en la producción intracelular que lleva a la muerte celular, pudieran relacionarse con la pérdida del tono dopaminérgico en las células pontinas. La administración de fármacos agonistas de los receptores dopaminérgicos D1 atenúa el desarrollo de procesos de muerte celular necrótica de origen oxidativo en el cultivo de células corticales de ratón [67].

La hipótesis del estrés oxidativo se formuló para explicar la muerte de las células dopaminérgicas de la SNc [68, 69]. No se ha confirmado que sean los mecanismos relacionados con la producción aberrante de radicales libres y el fracaso de los sistemas antioxidantes de las células nigrales, los únicos involucrados en este proceso neurodegenerativo; no obstante, sí existen evidencias de que ellos participan de manera importante en las vías de señalización que disparan la muerte neuronal [54, 68].

Las células del NPP que están bajo la influencia del aumento de la neurotransmisión glutamatergica, pudieran ser susceptibles al daño oxidativo, si se tiene en cuenta que la actividad glutamatergica exacerbada, secundaria a la lesión neurotóxica de la SNc, se asocia con procesos de excitotoxicidad que implican el fracaso en el funcionamiento de las bombas iónicas dependientes de ATP y de los procesos metabólicos mitocondriales. Ambos pueden desencadenar un incremento del estrés oxidativo intracelular [54].

La liberación excesiva de GLU se ha asociado con la activación de un grupo de proteínas quinasas secundario, y a la fosforilación de los receptores glutamatergicos NMDA [70]. Algunas de estas enzimas son la tirosina quinasa, la proteína quinasa activada por mitógeno y la proteína quinasa dependiente de AMPc [70]. Aunque no se conocen con exactitud los sustratos de estas proteínas, se sabe que la inhibición de estas o el bloqueo de los receptores NMDA previene la ocurrencia de muerte celular en el cultivo de neuronas hipocámpales, cerebelosas y motoneuronas espinales [71, 72].

En las neuronas pontinas del hemisferio derecho pudieran confluír los mecanismos antes mencionados que se derivan del aumento de la neurotransmisión glutamatergica y de la pérdida de la eferencia dopaminérgica procedente de la SNc. La conjunción de estos mecanismos pudiera promover las señales de muerte observadas en este estudio. Los hallazgos inmunohistoquímicos apuntan a que la muerte celular siga un curso necrótico, debido al escaso número de células que se tiñeron simultáneamente en el estudio de TUNEL y de DAPI; aunque no se descarta la posibilidad de que también pueda presentarse muerte apoptótica.

En el NPP izquierdo, donde no se observó inmunorreactividad a TUNEL, la actividad pontina contralateral a la inyección de la neurotoxina 6-OHDA se conserva intacta. Este hallazgo refuerza la función que realiza el desbalance de los diferentes sistemas de neurotransmisión, asociada con el estatus parkinsoniano en el disparo de mecanismos de muerte celular en estructuras como el NPP.

49. Hirsch EC, Graybiel AM, Duyckaerts C, Javoy-Agid F. Neuronal loss in the pedunculo-pontine tegmental nucleus in Parkinson Disease and in Progressive Supranuclear Palsy. *Proceeding Natl Acad Sci USA* 1987; 84:5976-80.

50. Pahapill P, Lozano A. The Pedunculo-pontine Nucleus and Parkinson's Disease. *Brain* 2000;123:1767-83.

51. Heise CE, Teo ZCh, Wallace BA, Ashkan K, Benabid AL, Mitrofanis J. Cell survival patterns in the pedunculo-pontine tegmental nucleus of MPTP monkeys and 6-OHDA - lesioned rats: evidence for differences to idiopathic Parkinson's disease patients? *Anat Embryol* 2005;210:287-302.

52. Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. *Ámbito Farmacéutico* 2003; 22(6):100-6.

53. Schmechel DE. Assessment of ultrastructural changes associated with Apoptosis. En: Yusef A, Hannun RM. Eds. *Apoptosis in Neurobiology: Concepts and Methods*. Londres, Nueva York, Washington Ed: Press Boca Raton 1999:153-81.

54. Martin LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease and injury. *Int J Mol Med* 2001;7(5):455-78.

55. Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A. Mechanism of cell death in experimental models of Parkinson's Disease. *Funct Neurol* 2000; 15(4):229-37.

56. Dingleline R, Bain Mc. Glutamate and Aspartate En: Siegel G, Agranoff B, Albers W, Fisher S, Uhler M. ed. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects*. Philadelphia, Baltimore, Nueva York Ed: Lippicott Williams & Williams 1999:315-33

57. Obrenovitch TP, Urenjak J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Progress in Neurobiology* 1997;51:39-87.

58. Skapper SD, Facci L, Strijbos PJ. Neuronal protein kinase signalling cascade and excitotoxic cell death. *Ann NY Acad Sci* 2001;939:11-22.

59. Nakatsu Y, Kotake Y, Komazaki K, Hakoziaki H, Taguchi R, Kume T, Akaike A, Ohta S. Glutamate excitotoxicity is involved in cell death caused by tributyltin in cultured rat cortical neurons. *Toxicol Sci* 2006;89(1): 235-42.

60. Obrenovitch T. Excitotoxicity in Neurological disorders: An alternative Viewpoint. En: Eng H, Marwah J (eds.). *Neuroprotection: Basic & Clinical Aspects*. Nueva York Ed.: Prominent Press 2001:160.

61. Albin RL, Greenamyre JT. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* 1989;42: 733-8.

62. Obrenovitch T, Urenjak J, Zilkha E, Jay TM. Excitotoxicity in neurological disorders - the glutamate paradox. *Int J Developmental Neuroscience* 2000;18:281-7.

63. Rego Ch, Oliveira C. Mitochondrial Dysfunction and Reactive oxygen Species in Excitotoxicity and Apoptosis: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative Disease. *Neurochemical Res* 2003;28(10): 1563-74.

64. Bernhardt RV. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? *Revista Chilena de Neuropsiquiatría* 2004;42(4): 281-92.

Estos resultados confirman que la muerte de las células dopaminérgicas de la SNc por inyección de la neurotoxina 6-OHDA, se asocia con cambios en la liberación de neurotransmisores como el GLU y el GABA en estructuras que anatómicamente y funcionalmente están muy relacionadas con los ganglios basales, como el NPP. Estos cambios, junto con la pérdida del tono dopaminérgico, pueden convertirse en eventos disparadores de mecanismos

de muerte celular en las células pontinas, lo cual a largo plazo pudiera contribuir con la degeneración nigral y el desbalance entre los sistemas de neurotransmisión.

Sería muy interesante ahondar en el estudio de los eventos moleculares y en los detalles estructurales que caracterizan el proceso de muerte celular en el NPP, que confirmen o rechacen el curso necrótico del proceso propuesto en el presente trabajo.

65. Bahr BA, Bendiske J, Brown QB, Munira thinam S, Caba E, Rudin M, Urwyler S, Sauter A, Rogers G. Survival signaling selective neuroprotection through glutamatergic transmission. *Exp Neurol* 2002;174(1): 37-47.

66. Hallet PJ, Standaert DG. Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacology & Therapeutics* 2004; 102:155-74.

67. Hoh JS, Gwag BJ. Attenuation of oxidative neuronal necrosis by a dopamine D1 agonist

in mouse cortical cell cultures. *Exp Neurol* 1997;146(2):604-8.

68. Mayeux R. Epidemiology of Neurodegeneration. *Ann Rev. Neurosciences* 2003; 26:81-104.

69. Everse J, Coates P. Role of the Peroxidases in Parkinson's disease: A hypothesis. *Free Radicals & Medicine* 2005;38:1296-310.

70. Skapper SD, Facci L, Strijbos PJ. Neuronal protein kinase signalling and excitotoxic cell

death. *Ann NY Acad Sci* 2001;939:11-22.

71. Giordano G, Sánchez-Pérez AM, Montoliu C, Berezney R, Malyavanthum K, Costa LG, Calvete JJ, Felipe V. Activation of NMDA receptors induces protein kinase A-mediated phosphorylation and degradation of matrix. Blocking these effects prevents NMDA-induced neuronal death. *J Neurochem* 2005;94(3): 808-18.

72. Hu JH, Krieger C. Protein phosphorylation networks in motor neuron death. *Prog Drug Res* 2002;59:71-109.

Recibido en agosto de 2006. Aprobado en octubre de 2006.