



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Bioquímica y Biología Molecular

**Caracterización molecular y determinación del
perfil cognitivo de modelos de parkinsonismo
en rata inducidos por 6-OHDA**

María Victoria Sosti

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Caracterización molecular y determinación del perfil cognitivo de modelos de parkinsonismo en rata inducidos por 6-OHDA

Memoria presentada por María Victoria Sosti para aspirar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular i Biomedicina

Barcelona 2013

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr Jaime Kulisevsky Bojarski y del Dr. Fabián Arenas Ríos en la Unidad de Trastornos del Movimiento del Servicio de Neurología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau – IIB SANTPAU

Tesis adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Jaime Kulisevsky Bojarsky
Director

Dr. Fabián Arenas Ríos
Co-director

Dr. José Aguilera
Tutor

María Victoria Sosti
Doctorando

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que de alguna manera han hecho posible que hoy escriba estas líneas.

En primer lugar al Dr. Jaime Kulisevsky por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo doctoral bajo su dirección.

Al Dr. José Aguilera por su disponibilidad desde el primer día.

A mi compañero de laboratorio, el Dr. Fabián Arenas por su ayuda, dedicación y paciencia.

A los neuropsicólogos del grupo, Ramón, Carmen y especialmente Saúl por brindarme sus conocimientos y ayudarme a comprender mejor el mundo de la neuropsicología.

A Roser por mostrarse siempre dispuesta a ayudarme.

Al personal del animalario, Luís, Margarita, Asumpta y especialmente a Antonia por enseñarme a trabajar con animales.

A Gerard por compartir una pasión en común que es el fútbol.

Por último al resto de la Unidad de Trastornos del Movimiento, Javier, Berta, Antonia, Jordi y Alex porque siempre supe que podía contar con ellos.

ABREVIATURAS

ACC, corteza cingulada anterior

AMPc, adenosil monofosfato cíclico

ANOVA, análisis de varianza

CD, discriminación compuesta

cDNA, DNA complementario

CL, Cuerpos de Lewy

COMT, catecol-O-metil-transferasa

CPF, corteza prefrontal

CPF-DL, corteza prefrontal dorsolateral

CPF-VL, corteza prefrontal ventrolateral

CPU, caudado-putamen

DA, dopamina

DAT, transportador de dopamina

DCL, deterioro cognitivo leve

dNTP, desoxirribonucleótido trifosfato

DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DrDx, receptores dopaminérgicos

EMT, error memoria de trabajo

EDS, cambio extradimensional

EP, enfermedad de Parkinson

HVA, ácido homovanílico

IDS, cambio intradimensional

LC, *locus coeruleus*

L-DOPA, L-3,4,-dihidroxifenilalanina

LRRK2, *leucine rich repeat kinase 2*

MAO-B, monoamino oxidasa-B

mCPF, corteza prefrontal medial

MFB, *medial forebrain bundle*

MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

MPP⁺, 1-metil-4-fenilpiridina

mRNA, RNA mensajero

NA, noradrenalina

NbM, núcleo basal de Meynert

NOR, prueba de reconocimiento de objetos nuevos

PINK1, *PTEN-induced kinase 1*

REV, aprendizaje de inversión

RT, retrotranscripción

SD, discriminación simple

SEM, error estándar de la media

SNM, síntomas no motores

SNpc, pars compacta de la sustancia negra

TH, tirosina hidroxilasa

VMAT-2, transportador vesicular de monoaminas

VTA, *ventral tegmental area*

WCST, *Wisconsin Card Sort Test*

6-OHDA, 6-hidroxidopamina

5-HIAA, 5-hidroxi-indolacético

5-HT, serotonina

α Syn, α -sinucleína

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Justificación del trabajo	3
I.2. Enfermedad de Parkinson: generalidades	4
I.3. Neuropatología de la enfermedad de Parkinson	5
I.4. Modelos experimentales de parkinsonismo en roedores	8
I.4.1. Modelos genéticos	10
I.4.2. Modelos farmacológicos	11
I.4.3. Parkinsonismo inducido por neurotoxinas	12
I.4.3.1. Modelo inducido por pesticidas : Rotenona y Paraquat	13
I.4.3.2. Modelo inducido por MPTP	14
I.4.3.3. Modelo inducido por 6-hidroxidopamina	17
I.5. Síntomas no motores en la enfermedad de Parkinson	20
I.5.1. Trastornos del sueño	20
I.5.2. Alteraciones autonómicas	21
I.5.3. Alteraciones sensoriales	22
I.5.4. Trastornos neuropsiquiátricos	22
I.5.5. Alteraciones cognitivas	23
I.6. Deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson	24
I.6.1. Alteraciones ejecutivas	25
I.6.2. Memoria	27
I.6.3. Habilidades visuoespaciales	28
I.7. Bases fisiopatológicas del deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson	..29
I.8. Tratamiento y cognición	31
I.9. Estudio del deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson mediante el uso de modelos de parkinsonismo en roedores	35
I.9.1. Funciones ejecutivas	36
I.9.1.1. Laberinto de Morris	36

I.9.1.2. Laberinto en T	36
I.9.1.3. Laberinto radial	37
I.9.1.4. Prueba de cambio de set atencional	37
I.9.1.5. Test del tiempo de reacción a cinco elecciones seriales (five choice serial reaction time task)	38
I.9.2. Aprendizaje y memoria	38
I.9.2.1. Prueba de reconocimiento de objetos nuevos	38
I.9.2.2. Pruebas de evitación pasiva y activa	39
I.9.2.3. Prueba de reconocimiento social	39
I.9.3. Estudio del deterioro cognitivo en modelos genéticos de la enfermedad de Parkinson	40
I.9.4. El modelo de MPTP utilizado en el estudio del deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Parkinson	41
I.9.5. Utilización del modelo de 6-OHDA para el estudio del deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
M. MATERIALES Y MÉTODOS	49
M.1. Animales de experimentación	51
M.2. Lesión dopaminérgica unilateral mediante la inyección de 6-OHDA en el MFB y verificación de la lesión <i>in vivo</i>	51
M.3. Evaluación del comportamiento cognitivo en modelo unilateral de parkinsonismo en rata inducido por 6-OHDA	54
M.3.1. Diseño experimental	54
M.3.2. Privación de comida	55
M.3.3. Estudio de la memoria de trabajo en laberinto radial de ocho brazos	56
M.3.3.1. Aparato	56
M.3.3.2. Fase de ambientación	57
M.3.3.3. Fase de entrenamiento/evaluación	57
M.3.3.4. Fase de medición	57

M.3.4. Estudio de la memoria de reconocimiento mediante la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (<i>NOR</i>)	58
M.3.4.1. Fase de ambientación	58
M.3.4.2. Fase de medición	59
M.3.5. Evaluación de síntomas neuropsiquiátricos : grado de anhedonia	59
M.3.6. Estudio de la habilidad olfatoria mediante la prueba del alimento escondido	60
M.3.6.1. Fase de familiarización	61
M.3.6.2. Fase de medición	61
M.3.7. Estudio de la alteración de la flexibilidad cognitiva mediante la prueba de cambio de set atencional	61
M.3.7.1. Aparato	62
M.3.7.2. Habitación	62
M.3.7.3. Entrenamiento	62
M.3.7.4. Medición	63
M.4. Verificación de la lesión dopaminérgica mediante Inmunohistoquímica	65
M.5. Análisis estadístico I	67
M.6. Evaluación del comportamiento cognitivo en modelo de lesión dopaminérgica unilateral en respuesta al tratamiento crónico con L-DOPA	67
M.6.1. Diseño experimental	68
M.6.2. Protocolo de tratamiento crónico con L-DOPA	69
M.6.3. Valoración de las discinesias inducidas por el tratamiento crónico de L-DOPA	69
M.6.4. Valoración de la memoria de trabajo post-tratamiento crónico con L-DOPA	70
M.6.5. Estudio de la flexibilidad cognitiva post-tratamiento crónico con L-DOPA	70
M.6.6 Análisis estadístico II	70
M.7. Análisis molecular de la respuesta al tratamiento crónico con L-DOPA	71

M.7.1. Extracción de RNA total de la corteza prefrontal	71
M.7.2. Transcripción reversa	71
M.7.3. PCR cuantitativa en tiempo real	72
M.7.4 Análisis estadístico III	75
M.8. Generación de un modelo de lesión dopaminérgica asimétrica bilateral	75
M.8.1. Evaluación de la actividad motora de los modelos con lesión dopaminérgica bilateral asimétrica	75
M.8.2. Evaluación de síntomas neuropsiquiátricos : grado de anhedonia	76
M.8.3. Determinación de dopamina y serotonina y sus respectivos metabolitos en el estriado y en la corteza prefrontal	76
M.8.4: Análisis estadístico IV	77
R. RESULTADOS	79
R.1. Estudio neuroquímico de la lesión dopaminérgica unilateral mediada por 6-OHDA	81
R.2. Valoración de la memoria de trabajo en modelo de lesión dopaminérgica unilateral en rata	83
R.3. Evaluación de la memoria de reconocimiento	84

R.4. Estudio de la función olfatoria y motivacional en rata con lesión dopaminérgica unilateral	85
R.5. Evaluación de la flexibilidad cognitiva en el modelo de rata hemiparkinsoniana	86
R.6. Evaluación de la actividad locomotora de las ratas lesionadas con 6-OHDA	89
R.7. Valoración de las discinesias inducidas por L-DOPA en el modelo de hemiparkinsonismo	89
R.8. Memoria de trabajo de las ratas lesionadas con 6-OHDA y tratadas con L-DOPA	90
R.9. Efecto del tratamiento crónico con L-DOPA en la flexibilidad cognitiva de ratas hemiparkinsonianas	91
R.10. Patrón de expresión de los receptores dopaminérgicos en la CPF de ratas hemiparkinsonianas en respuesta al tratamiento crónico con L-DOPA	93
R.11. Caracterización bioquímica del modelo de lesión dopaminérgica bilateral asimétrica	95
R.12. Caracterización neuropsiquiátrica de ratas con lesión dopaminérgica bilateral asimétrica : anhedonia	99
R.13. Caracterización motora del modelo bilateral asimétrico de lesión dopaminérgica	100
DISCUSIÓN	103
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXO I: Artículo <i>Modulation of the motor response to dopaminergic drugs in a parkinsonian model of combined dopaminergic and noradrenergic degeneration</i>	135
ANEXO II: Artículo <i>Noradrenergic modulation of the motor response induced by long-term levodopa administration in Parkinsonian rats</i>	145
ANEXO III: Patrón de expresión de los receptores dopaminérgicos en la corteza prefrontal: ipsilateral versus contralateral	155

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura I.1:	Neuropatología de la enfermedad de Parkinson	6
Figura I.2:	Progresión patológica de la enfermedad de Parkinson propuesta por Braak y cols	8
Figura I.3:	Mecanismos de acción de agentes utilizados para generar modelos animales de parkinsonismo	15
Figura I.4:	Proporción relativa de los dominios cognitivos afectados en el DCL	25
Figura I.5:	Efecto del reemplazo dopaminérgico sobre las funciones cognitivas en la EP	33
Figura M.1:	Lesión dopaminérgica unilateral por inyección de 6-OHDA en MFB	52
Figura M.2 :	Diseño experimental en modelo unilateral inducido por 6-OHDA	55
Figura M.3:	Esquema del laberinto radial de ocho brazos	56
Figura M.4:	Prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR)	59
Figura M.5 :	Prueba de cambio de set atencional	64
Figura M.6:	Diseño experimental en modelo unilateral inducido por 6-OHDA y tratamiento crónico con L-DOPA	68
Figura M.7:	Sistema <i>Actimeter</i> para medir actividad locomotora espontánea	76
Figura R.1:	Integridad dopaminérgica de las vías nigroestriada y mesolímbica tras la administración 6-OHDA en MFB izquierdo	82
Figura R.2:	Efectos de la lesión dopaminérgica unilateral en el comportamiento de los animales en el laberinto radial	84
Figura R.3:	Efecto de la lesión dopaminérgica en la memoria de reconocimiento	85
Figura R.4:	Efectos de la administración 6-OHDA en la habilidad olfatoria y motivacional	86
Figura R.5:	Efectos de la lesión con 6-OHDA en la ejecución de la prueba de cambio de set atencional	88
Figura R.6:	Discinesias inducidas por la administración crónica de L-DOPA a diferentes dosis	90

Figura R.7:	Efecto del tratamiento crónico de L-DOPA en la memoria de trabajo	91
Figura R.8:	Efecto del tratamiento crónico con L-DOPA en la prueba de cambio de set atencional	92
Figura R.9:	Patrón de expresión de los receptores dopaminérgicos en la CPF	94
Figura R.10:	Niveles estriatales de dopamina en animales con lesión bilateral asimétrica por 6-OHDA	95
Figura R.11:	Niveles estriatales de los metabolitos de DA en animales con lesión bilateral asimétrica inducida por 6-OHDA	96
Figura R.12:	Niveles estriatales de 5-HT y 5-HIA en animales con lesión dopaminérgica bilateral	97
Figura R.13:	Niveles de DA y sus respectivos metabolitos en la CPF de los animales con lesión bilateral asimétrica inducida por 6-OHDA	98
Figura R.14 :	Niveles de 5-HT y 5-HIA en la CPF de los animales con lesión dopaminérgica bilateral asimétrica	99
Figura R.15:	Efecto de la inyección bilateral asimétrica de 6-OHDA sobre el consumo de sucrosa y correlación con el recambio de serotonina	100
Figura R.16:	Efecto de la inyección bilateral asimétrica de 6-OHDA sobre la actividad motora del modelo 4/2	101
Figura D.1:	Diagramas de la corteza prefrontal de la rata	106
Figura D.2.	Proyecciones dopaminérgicas cortico-estriatales en humanos	109
Figura D.3.	Proyecciones dopaminérgicas cortico-estriatales en roedores	110

TABLAS

Tabla I.1.	Principales características de los modelos transgénicos desarrollados para la EP	11
Tabla I.2.	Comparación entre los distintos modelos murinos de la EP	19
Tabla I.3.	Síntomas no motores asociados a la enfermedad de Parkinson	21
Tabla I.4:	Déficits fronto-ejecutivos y tests neuropsicológicos para su valoración	26
Tabla M.1:	Texturas y medios de escarbados utilizados en la prueba de cambio de set atencional	65
Tabla M.2.	Oligonucleótidos utilizados en el estudio de la expresión de transcritos para los receptores de dopamina en CPF mediante PCR cuantitativa en tiempo real	73
Tabla R.1:	Efecto de la lesión con 6-OHDA en la actividad locomotora	89
Tabla R.2:	Correlación entre la expresión de DrD5 en CPF y el rendimiento en la prueba de cambio de set	94

INTRODUCCIÓN

I.1. Justificación del trabajo

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas con mayor impacto en las actividades de la vida diaria, ya sea en sus manifestaciones motoras como cognitivas.

Si bien en la actualidad las alteraciones motoras pueden ser aceptablemente controladas por fármacos que no consiguen detener el avance de la enfermedad, el deterioro cognitivo sigue careciendo de un tratamiento eficaz y por tanto constituye una de las principales fuentes de incapacidad en la enfermedad.

Para poder aplicar una terapia adecuada al deterioro cognitivo, es necesario distinguir entre los aspectos cognitivos presentes en etapas tempranas, de aquellos que se presentan a lo largo del curso de la enfermedad , así como de los que eventualmente sólo se manifiestan en estadios tardíos de la enfermedad.

En este sentido investigar en profundidad los mecanismos subyacentes al deterioro cognitivo en etapas pre-motoras de la EP, es clave para mejorar el conocimiento de la progresión de la enfermedad y para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas que puedan prolongar una buena calidad de vida para el paciente.

El presente trabajo se centra en el estudio de las alteraciones cognitivas de la EP mediante la utilización de modelos de parkinsonismo en rata con degeneración dopaminérgica sin afectación motora (ya sean preestablecidos ó nuevos) y así aproximarse a las primeras etapas de la enfermedad.

I.2. Enfermedad de Parkinson: generalidades

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo de carácter crónico y progresivo considerado multifactorial producto del efecto combinado de factores medioambientales y diferentes grados de susceptibilidad genética.

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en la población general después de la enfermedad de Alzheimer [1], con una incidencia media estimada situada entre 20/100.000 habitantes/año y una prevalencia de 150/100.000 habitantes [1, 2].

Durante décadas, la EP ha sido considerada una enfermedad puramente motora caracterizada principalmente por síntomas como bradicinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural [3, 4].

La presentación de estas alteraciones suele ser de inicio unilateral y durante la evolución de la enfermedad se vuelve bilateral manteniendo en general la asimetría [3, 5].

Está ampliamente reconocido que la EP no sólo cursa con síntomas motores, sino también con síntomas no motores (SNM) que constituyen una causa muy importante de discapacidad de esta enfermedad [6]. Los SNM incluyen disfunción cognitiva, trastornos psiquiátricos (desde depresión y ansiedad, hasta alucinaciones y psicosis), trastornos del sueño (ej. somnolencia excesiva de día y trastorno del comportamiento de la fase de sueño de movimientos oculares rápidos; *REM*), alteraciones sensoriales (como la hiposmia) y disfunción autonómica (ej. estreñimiento, hipotensión postural, disfunción eréctil y trastornos genitourinarios) [6].

Los SNM se presentan en el 90 % de los pacientes, y muchos de ellos pueden preceder a la aparición de los síntomas motores, como es el caso del estreñimiento crónico, los trastornos del sueño REM y la hiposmia [6-9]. A pesar de que su reconocimiento es creciente, los SNM todavía son poco identificados por los

especialistas, situación que termina repercutiendo negativamente en la calidad de vida del paciente y en la eficacia del tratamiento [6, 10].

I.3. Neuropatología de la enfermedad

La neuropatología característica de la EP es la degeneración específica de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc) y la presencia de inclusiones fibrilares citoplasmáticas llamadas cuerpos de Lewy (CL), cuya mayor proporción proteica la conforma la α -sinucleína (α -Syn) [3, 4, 11, 12]

La detección de los CL constituye el marcador más sensible y específico en el diagnóstico patológico post-mortem de la enfermedad [11] (Figura. I.1). Sin embargo, aún no está del todo esclarecido el papel de los CL en la muerte neuronal.

La vulnerabilidad celular no sólo se limita a neuronas dopaminérgicas sino a otros tipos celulares no dopaminérgicos. Dentro de esta población celular se encuentran neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* (LC), neuronas serotoninérgicas del núcleo del Rafe y células colinérgicas del núcleo basal de Meynert y del núcleo pedúnculo pontino [13].

En la actualidad se reconoce a la enfermedad de Parkinson como una sinucleopatía multisistémica [14] que se manifiesta en los nervios periféricos cutáneos, sistema nervioso autonómico, sistema nervioso entérico, médula espinal, núcleo motor dorsal del vago, estructuras límbicas (amígdala e hipocampo), y neocórtex [13, 15, 16], con los consecuentes síntomas motores y no motores.

Cuando la pérdida neuronal dopaminérgica de la SNpc alcanza el 60–70%, aparecen los síntomas motores clásicos de la enfermedad y se hacen más pronunciados a medida que el proceso neurodegenerativo avanza [17, 18]. Como consecuencia de esta muerte neuronal hay una severa disminución dopaminérgica estriatal.

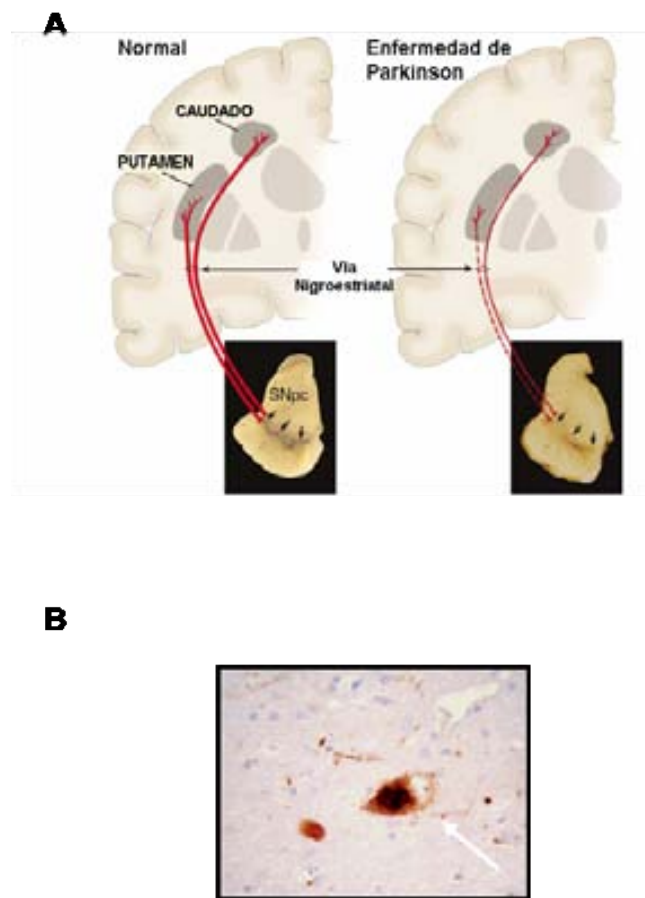


Figura 1.1: *Neuropatología de la enfermedad de Parkinson.* Se muestra **(A)**, la degeneración de la vía nigroestriatal y **(B)** Inclusiones de α -sinucleína una en neurona de la SNpc Modificado de De Dauer y cols [4, 19]. SNpc, *sustancia nigra pars compacta*

Mediante estudios clinicopatológicos basados en la presencia de CL y muerte neuronal, Braak y cols. [20] sugirieron un modelo anatómico de la progresión de la EP, donde el proceso neurodegenerativo parecía seguir un curso progresivo caudorrostral a lo largo del eje encefálico. Así, se establecieron 6 estadios de progresión de la enfermedad, de los cuales en los tres estadios iniciales (I-III) la neurodegeneración queda confinada al tronco del encéfalo, provocando síntomas motores leves o inexistentes. En el cuarto estadio (IV) los síntomas motores se manifiestan clínicamente y se detecta depósito de CL con degeneración neuronal en la amígdala, ciertas regiones del mesocórtex temporal medial, y en los núcleos colinérgicos de la base cerebral. En los dos estadios finales (V-VI) la patología se extiende primero a las

áreas corticales asociativas y posteriormente a áreas corticales motoras, sensitivas y sensoriales primarias (Figura 1.2).

A pesar de proporcionar un marco razonable para la evolución patológica de la EP, la hipótesis de Braak no explica del todo la enfermedad [14, 21, 22]. Por un lado no existen evidencias que correlacionen la asimetría patológica con la asimetría de los signos neurológicos [14]; y por otra parte no está claro si la acumulación de α -Syn en SNpc se correlaciona con el déficit dopaminérgico estriatal como principal causa de los síntomas motores de EP [22]. En este sentido, Stern y cols. [14] en un abordaje pragmático, proponen tres fases para caracterizar la progresión de la enfermedad:

FASE 1 de la EP: Preclínico; presencia de patología específica de la enfermedad identificada a través de biomarcadores o ensayos de imagen con trazadores específicos[‡]. En esta fase hay ausencia de signos y síntomas clínicos.

FASE 2 de la EP: Premotor; presencia de síntomas no motores (SNM) tempranos debido a patología extranigral.

FASE 3 de la EP: Motor; existe suficiente déficit dopaminérgico nigroestriatal como para causar manifestaciones motoras clásicas, seguidas de SNM tardíos debido a la extensión de la patología.

[‡]*El estudio de biomarcadores y trazadores específicos de las enfermedades neurodegenerativas representa un campo activo y prometedor en la investigación biomédica.*

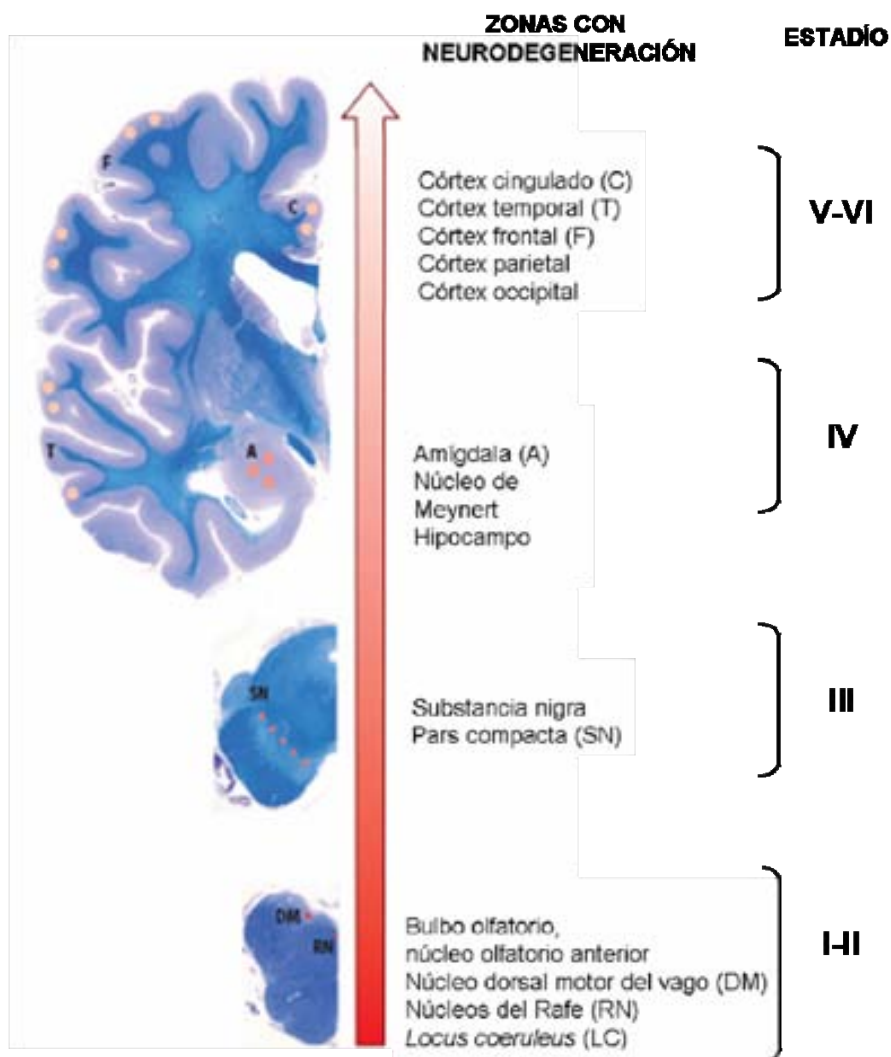


Figura I.2: Progresión patológica de la enfermedad de Parkinson propuesta por Braak y cols. Modificado de De Shulman y cols [13].

I.4. Modelos experimentales de parkinsonismo en roedores

Los modelos de parkinsonismo en roedores representan una herramienta de gran utilidad tanto en el estudio de los mecanismos implicados en los diferentes síntomas de la enfermedad de Parkinson (EP), como en el estudio de la eficacia de posibles tratamientos neuroprotectores [23]. El establecimiento de dichos modelos se ha basado en la alteración de la transmisión dopaminérgica nigroestriatal [24] que

provoca los rasgos neuroquímicos más relevantes de la EP (*i.e.* muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, junto a una disminución del contenido de DA estriatal; ver I.3) .

Los esfuerzos encaminados al desarrollo de un modelo roedor que fuese capaz de reproducir la sintomatología y la neuropatología de la EP, han tenido en cuenta la naturaleza multifactorial de la etiopatogenia (*i.e.* ya sea factores medioambientales como factores genéticos).

Teóricamente, un modelo fidedigno de la EP debería presentar un alto grado de validez (i) constructiva, (ii) sintomatológica, (iii) bioquímica, (iv) patológica y (v) predictiva. En cada uno de estos puntos deberían presentar:

(i) constructiva: similitudes en la patogénesis (*i.e.* estrés oxidativo, proceso inflamatorio, alteración de la cadena respiratoria, e inhibición del proteosoma);

(ii) sintomatológica: similitudes en la sintomatología tanto motora como no motora;

(iii) bioquímica: similitudes en la reducción dopaminérgica estriatal y alteraciones en otros neurotransmisores.

(iv) patológica: similitudes en la degeneración de la vía nigroestriatal y deposición de CL, y

(v) predictiva: la habilidad de poseer la sensibilidad para identificar positivamente agentes que clínicamente serían efectivos contra la enfermedad y así desarrollar nuevas estrategias terapéuticas [24-26].

Para producir un modelo murino de parkinsonismo se han utilizado neurotoxinas, fármacos y animales transgénicos [23-25, 27] (Tabla I.2).

Sin embargo, ninguno de los modelos desarrollados en roedores, los cuales repasaremos brevemente a continuación, ha sido capaz de englobar en su totalidad tanto las características clínicas como neuropatológicas de la EP [23, 26, 28, 29]

I.4.1. Modelos genéticos

El establecimiento de modelos murinos basados en las mutaciones genéticas asociadas a la EP, ha aportado información respecto a los mecanismos celulares involucrados en la neurodegeneración de la enfermedad. Estos modelos también podrían otorgar el contexto adecuado para, en última instancia, desarrollar y probar terapias con capacidad neuroprotectora o neuroregenerativa [19, 23, 26]. Así, para mutaciones autosómico-dominantes causantes de la EP, se han generado roedores *knock-in* de α -sinucleína y de la quinasa LRRK2 (*leucine rich repeat kinase 2*); o roedores *knock-out* o *knock-down* si la causa de la enfermedad se debe a mutaciones autosómico recesivas como la de los genes PARK, DJ-1, y PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) [26].

En la Tabla I.1 se resumen los diferentes modelos de roedores transgénicos, tanto para mutaciones en genes de tipo autosómico dominantes, como autosómico recesivos. De dicha tabla se extrae la ausencia de degeneración de las neuronas dopaminérgicas en cualquiera de estos modelos. Se especula que este hecho podría deberse a que estas neuronas son particularmente resistentes tanto a la sobreexpresión de α -Syn y de LRRK-2, como a la ausencia de Parkina, PINK1 ó DJ-1. Probablemente esto sea debido a la expresión intrínseca de factores protectores u otras características genéticas asociadas a la supervivencia de las células dopaminérgicas frente al efecto tóxico de las mutaciones estudiadas [26].

Tabla I.1 : Principales características de los modelos transgénicos desarrollados para la enfermedad de Parkinson

MODELOS	MUERTE NEURONAL DA Y NO DA	DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL	INCLUSIONES INTRACELULARES
α-Syn			
Ratón Thy1(*) (WT, A30P, A53T)	DA- No DA+	+	+
Ratón PrP (**) (WT, A30P, A53T)	DA- No DA+	+	+
Rata AAV (WT, A53T)	DA+ No DA-	No determinado	- (α-syn inclusiones no fibrilares)
LRRK-2			
Ratón BAC (R1441G)	DA- (↓TH) No DA-	No determinado	-
Parkin			
Ratón (KO)	DA- No DA-	+	-
Ratón (BAC-DAT-Q311X)	DA+ No DA-	No determinado	+
PINK-1			
Mouse (KO)	DA- No DA-	+	-
DJ-1			
Mouse (KO)	DA- No DA-	+	-

Nota: La expresión del transgen está bajo el control del promotor de (*) Thy1 y (**) PrP

BAC: cromosoma bacteriano artificial

Adaptación de Dawson y col, 2010 [26].

I.4.2. Modelos farmacológicos

La capacidad y selectividad de ciertos fármacos para alterar vías metabólicas claves en la homeostásis neuronal, se ha utilizado en el diseño de modelos farmacológicos de la EP en roedores. Es el caso de la reserpina y el haloperidol.

La reserpina actúa como inhibidor irreversible del transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2), provocando la pérdida de la capacidad de almacenamiento, no sólo de dopamina (DA), sino también de noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) [24]. Dependiendo del tipo de administración de este fármaco es posible obtener dos modelos con fenotipos diferentes. Cuando la reserpina es administrada a

concentración elevada en una dosis única, se obtiene un modelo con deficiencias motoras severas [30], en tanto que la administración de dosis moderadas repetidas inducen alteraciones motoras progresivas [30].

Si bien el modelo de reserpina reproduce las alteraciones bioquímicas de la EP de manera transitoria e induce rasgos clínicos (ej. bradicinesia), en ambos fenotipos no se observa degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [24]. Por este motivo, el modelo de reserpina se restringe sólo al estudio de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento sintomático de la enfermedad [24].

Por otra parte, el haloperidol es un antagonista de los receptores dopaminérgicos D_2 y con menor grado de afinidad de los receptores D_1 . Tras la administración del fármaco, el bloqueo dopaminérgico resultante se manifiesta en el animal con rigidez muscular y catalepsia y, al igual que en el modelo de reserpina, en animales tratados con haloperidol no se observa degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [24].

1.4.3. Parkinsonismo inducido por neurotoxinas

De todos los modelos de parkinsonismo en roedores, los modelos inducidos con neurotoxinas son los que, hasta la actualidad, se han utilizado más ampliamente. Estos modelos se han desarrollado tanto en rata como en ratón para el estudio de los posibles mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad. Además, se han utilizado para valorar la eficacia de distintos tratamientos sintomáticos, neuroprotectores y/o neurorestauradores [24, 31].

Los modelos más estudiados y utilizados son generados mediante la administración de rotenona y paraquat [32], 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y 6-hidroxdopamina (6-OHDA) [19, 28, 33].

I.4.3.1 Modelo inducido por pesticidas : Rotenona y Paraquat

Dada la etiopatogenia multifactorial de la EP, se han utilizado diversas neurotoxinas ambientales para inducir parkinsonismo en roedores. Entre ellas destacan la rotenona y el paraquat [32].

La rotenona es un insecticida isoflavonoide de origen vegetal que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica. Su mecanismo de acción sobre la neurona dopaminérgica es la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial con la consecuente inhibición del proteosoma y produce también disfunción microtubular [31, 34, 35] (Figura I.3).

La administración crónica de rotenona en ratas, reproduce algunas de las características neuroquímicas, histopatológicas y conductuales de la EP, con degeneración preferente de la zona nigroestriada, inclusión de Cuerpos de Lewy y deficiencias motoras como hipocinesia, rigidez, postura encorvada y temblores [36], cuya severidad depende de la extensión de la lesión [32]. También se ha observado una activación microglial tanto en la SNpc como en el estriado, rasgos inflamatorios que concuerda con los hallados en el EP idiopático [37]. Todas estas evidencias apoyan la validez constructiva de este modelo [24], sin embargo aún no está claro que ventajas ofrece sobre los otros modelos neurotóxicos. Además su mayor limitación es la alta mortalidad que posee este modelo [38].

Por otra parte, el paraquat es un herbicida hidrofílico que atraviesa la barrera hematoencefálica a través del transportador de aminoácidos neutros y debido a que posee una estructura química similar al 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), es capaz de inducir daño mitocondrial, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno y generando estrés oxidativo [23, 32, 31, 38]. Además, diversos estudios en animales de experimentación han demostrado que el paraquat induce la sobreexpresión de α -Syn y formación de CL en neuronas dopaminérgicas de la SNpc [39-41]. Por este motivo este modelo ha sido utilizado principalmente en el estudio del proceso de

formación de CL en neuronas dopaminérgicas, así como el papel de α -Syn en la EP [38].

1.4.3.2. Modelo inducido por MPTP

El MPTP es altamente lipofílico, por lo que tras su administración sistémica atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica [23, 38]. El MPTP es una protoxina que requiere ser metabolizada a 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+) para ejercer su efecto tóxico [42]. Su metabolización ocurre en el cerebro, en astrocitos y células serotoninérgicas, por acción del enzima monoamino oxidasa-B (MAO-B) [23]. Una vez producido, el MPP^+ es capaz de entrar de manera específica en las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT) [43]. El MPP^+ inhibe al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, provocando reducción de los niveles de ATP hasta en un 20% [44].y un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno [45] (Figura 1.3).

La neurotoxicidad del MPTP ha sido demostrada en diversas especies animales, incluyendo macacos, ratones y gatos [31]. Sin embargo, las ratas han demostrado ser muy resistentes al MPTP, ya que, a diferencia de los ratones, requieren dosis elevadas de dicha neurotoxina para alcanzar el mismo grado de degeneración dopaminérgica [46]. Es por ello que para la obtención del modelo de parkinsonismo en rata se requiere aumentar la neurotoxicidad mediante la inyección estereotáxica de MPP^+ , o mediante la administración nasal de MPTP[47-49].

La magnitud de la lesión inducida por MPTP depende del régimen de administración de dicha neurotoxina [50], la dosis y el tiempo que transcurre entre cada inyección [31].

El régimen de administración aguda conduce a una disminución de dopamina estriatal del 90% y a una pérdida neuronal dopaminérgica de la SNpc irreversible de

aproximadamente el 70%,; dichas condiciones se mantienen dentro de los 7 días posteriores a la administración de MPTP [31].

El régimen subagudo, a diferencia del anterior, promueve una neurodegeneración más leve provocando entre un 40-50% de reducción de DA estriatal y un 30-40% de muerte de neuronas dopaminérgicas de la SNpc, manteniéndose dicha condición durante 21 días posterior a la inyección de MPTP[51] .

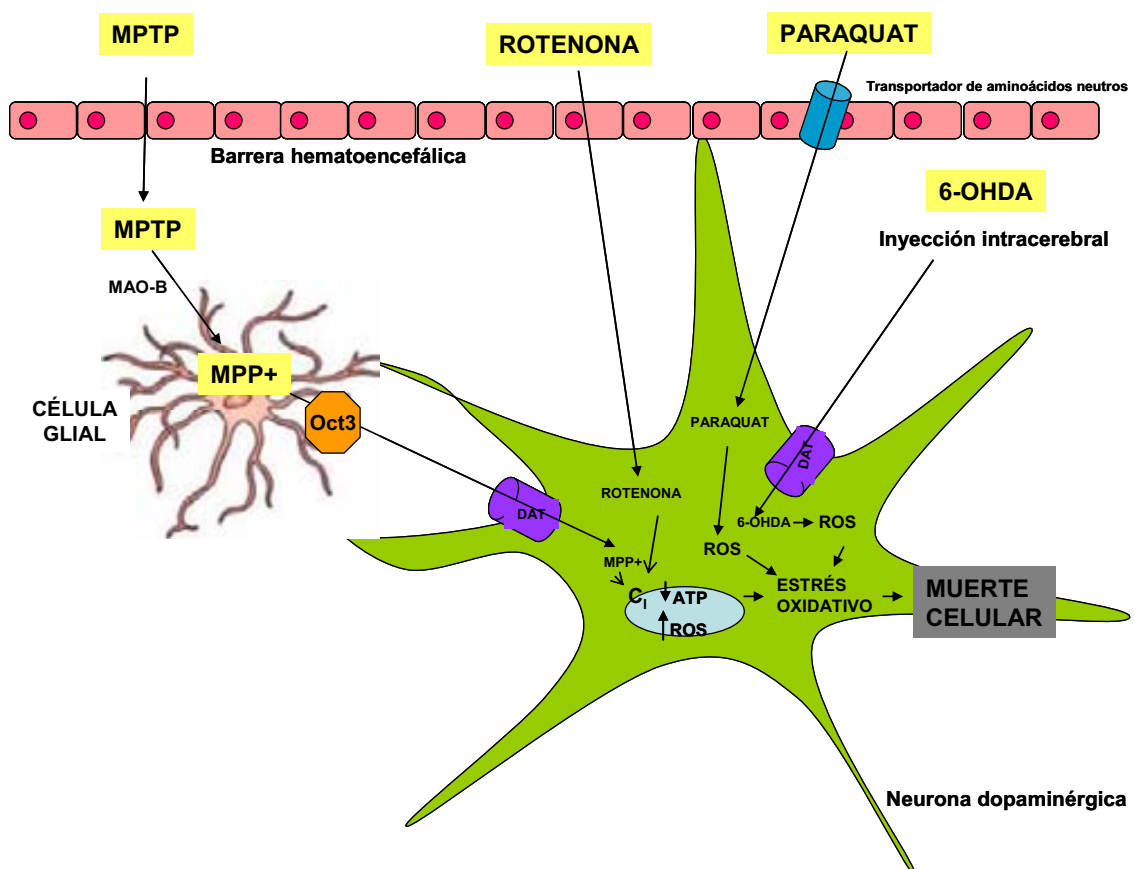


Figura I.3.:Mecanismos de acción de agentes utilizados para generar modelos animales de parkinsonismo. El MPTP y la rotenona atraviesan la barrera hematoencefálica; el primero se metaboliza a 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+), sale al espacio extracelular transportada por Oct3 y es captada por las neuronas dopaminérgicas a través del DAT. El MPP+ y la rotenona se acumulan en la mitocondria donde inhiben el complejo I (C₁) de la cadena respiratoria, provocando disminución en los niveles de ATP y aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), con la consecuente muerte celular. El Paraquat entra al SNC a través del transportador de aminoácidos neutros y dentro de las neuronas dopaminérgicas cataliza también la formación de ROS .La 6-OHDA es captada por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT). Después de consecutivas reacciones la 6-OHDA sufre autooxidación con la consecuente generación de ROS y posterior muerte celular Adaptado de Bove,J; Cicchetti,F y Beal,M [31-33]

Otros modelos intentan reproducir la condición de neurodegeneración progresiva de la EP, ya sea mediante la generación de modelos crónicos utilizando bombas que administran de forma continua dosis bajas de MPTP [52] ó mediante la co-administración de probenecid el cual reduce el metabolismo del MPTP [53].

El modelo agudo se ha utilizado para el estudio de los mecanismos de neuroinflamación y en poner a prueba estrategias protectoras. El modelo crónico se ha usado para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la muerte neuronal de la enfermedad [31, 38]. Además, el modelo de MPTP permite combinar factores genéticos y ambientales en el estudio de la EP, utilizando de manera combinada dicha neurotoxina con la gran variedad de modelos genéticos (*Knock-out* o *Knock-in*) [31].

Además, también se ha descrito que el modelo murino de MPTP es capaz de reproducir algunas de las alteraciones mitocondriales observadas en la EP [54].

A pesar de la gran utilidad que ha demostrado el modelo, una de sus carencias es la ausencia de Cuerpos de Lewy, marcador histopatológico de la enfermedad. [28, 31].

Además, a la hora de evaluar el comportamiento de los modelos de MPTP en roedores se ha de tener en cuenta que existen diferencias no sólo entre las cepas de ratones sino también entre subtipos dentro de una misma cepa, lo cual repercute en la ausencia de reproducibilidad de los resultados cuando se utiliza este modelo [31].

Otro factor a considerar es la alteración motora asociada a la magnitud de la lesión, resultando más difícil la interpretación de los resultados cuanto mayor es la lesión del sistema dopaminérgico [31].

I.4.3.3. Modelo inducido por 6-hidroxidopamina

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es la neurotoxina que más se utiliza en el desarrollo de modelos experimentales de la EP en roedores, particularmente en ratas. La utilización de 6-OHDA en el desarrollo de estos modelos, se realiza mediante la inyección intracraneal de esta neurotoxina para que produzca el daño neuronal, ya que atraviesa de forma parcial la barrera hematoencefálica [55]. La 6-OHDA posee una estructura química similar a la noradrenalina (NA) y dopamina (DA), por lo que presenta una alta afinidad por los transportadores de catecolaminas, siendo éste el mecanismo por el cual penetra en las células catecolaminérgicas [56]. Una vez dentro de las células, la 6-OHDA sufre autooxidación no enzimática produciendo especies reactivas de oxígeno y provocando estrés oxidativo que lleva a la muerte neuronal [57] (Figura I.3).

Para aumentar la especificidad de la 6-OHDA sobre las neuronas dopaminérgicas y proteger los terminales noradrenérgicos, previo a la inyección de dicha neurotoxina, se administra desipramina, un inhibidor del transportador de NA.

Según el sitio de inyección y de la dosis utilizada de 6-OHDA, se obtienen diferentes modelos de lesión de la vía nigroestriatal [31, 58, 59]. Si bien la 6-OHDA puede inducir lesión bilateral, cuando se la inyecta en ambos hemisferios o en los ventrículos, una alta proporción de los animales mueren por afagia y adipsia [60, 61], por lo que el modelo más utilizado es el de lesión unilateral, que posee una mortalidad más baja [31].

Si la administración estereotáxica unilateral se realiza en sub-regiones del complejo caudado-putamen (Cpu; *i.e.* estriado dorsal) se produce una degeneración retrógrada que ocurre entre 1 y 3 semanas posterior a la inyección de 6-OHDA [62], por lo que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc ipsilateral (*i.e.* SNpc del hemisferio lesionado) exhiben una morfología heterogénea, incluyendo la apoptótica [63]. En cambio, cuando la 6-OHDA es inyectada en la SNpc o en haz prosencefálico medial (MFB, del

inglés. *medial forebrain bundle*), la degeneración de las neuronas dopaminérgicas ocurre dentro de las 24 horas produciéndose la muerte neuronal por causas aparentemente no apoptóticas [31, 58, 64].

En el modelo estriatal, la aplicación única de 6-OHDA o la aplicación mediante infusión continua, produce degeneración lenta y progresiva, manifestándose entre un 30-75 % de pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc del hemiferio lesionado [31, 58].

En el modelo unilateral con aplicación de 6-OHDA en MFB, la lesión produce una reducción del 80-90 % de DA estriatal ipsilateral [31, 58]. En respuesta a la reducción dopaminérgica, se induce tanto la activación de la tirosina hidroxilasa (TH; enzima limitante de la síntesis de catecolaminas) en las neuronas dopaminérgicas residuales, así como un incremento en el número de receptores postsinápticos D2 en el estriado contralateral (*i.e.* estriado del hemisferio no lesionado) [65]. En consecuencia, los animales de este modelo presentan una rotación ipsilateral a la lesión cuando se les administran sustancias que aumentan la liberación de dopamina (ej. anfetamina), y muestran una rotación contralateral al de la lesión cuando reciben agonistas dopaminérgicos (ej. apomorfina) [58, 66]. Este fenómeno se utiliza para comprobar el correcto establecimiento de la lesión dopaminérgica.

Tanto el modelo estriatal como el modelo MFB tienen diferentes aplicaciones [31]. El modelo estriatal es utilizado para dilucidar los mecanismos de muerte celular y patogénesis implicada en la EP [67]; mientras que el modelo MFB es adecuado para estudiar las consecuencias de la disminución de actividad dopaminérgica y las estrategias terapéuticas, ya sea para el tratamiento de los síntomas motores como para la prevención de discinesias inducidas por L-3,4,-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) [68, 69], además de contribuir a un mejor conocimiento de los circuitos que conectan los ganglios basales [70].

Tabla I.2: Comparación entre los distintos modelos murinos de la EP.

MODELOS	SÍNTOMAS	PATOLOGÍA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Genéticos (formas recesivas y dominantes) ‡	Ligera alteración motora	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia o leve degeneración de las neuronas dopaminérgicas • Inclusiones tipo CL (Sólo en algunos casos) 	Validez constructiva	Ausencia o falta de degeneración nigroestriatal
Farmacológicos (Reserpina y Haloperidol)	Alteración motora severa o progresiva	Pérdida de la capacidad de almacenamiento, de DA, NA y serotonina	Afectación del sistema dopaminérgico, noradrenérgico y serotoninérgico	Ausencia de degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc
Inducido por pesticidas (Rotenona y Paraquat)	Deficiencias motoras	Degeneración de la vía nigroestriada, inclusión de CL y activación microglial en SNpc y estriado.	<ul style="list-style-type: none"> • Administración sistémica • Modelo adecuado para evaluar estrategias neuroprotectoras 	Alta mortalidad
Inducido por neurotoxinas: MPTP	<p>AGUDO: alteración motora y en la coordinación de movimientos</p> <p>CRÓNICO: Alteraciones motoras menos evidentes</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Muerte neuronal dopaminérgica masiva • Reducción de los niveles de DA en estriado • No presenta inclusiones intracelulares • Muerte neuronal dopaminérgica parcial • Reducción de inervación dopaminérgica en estriado • No presenta inclusiones intracelulares 	<ul style="list-style-type: none"> • Administración sistémica • Modelo bien caracterizado • Validez constructiva 	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente tóxico para el experimentador. • Fiabilidad reducida
Inducido por neurotoxinas: 6-OHDA	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración motora posterior a lesión bilateral • Actividad rotacional posterior a lesión unilateral 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de niveles de DA en el estriado • Pérdida masiva de neuronas dopaminérgicas • No presenta inclusiones intracelulares 	Modelo bien caracterizado	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere inyección intracerebral • Rápida y masiva neurodegeneración

‡ *ver tabla I.1*

Adaptación de Terzioglu, 2008 y Bové, 2012[23, 31].

A pesar que el modelo de 6-OHDA no induce la formación intracelular de CL o de diferentes agregados proteicos [28, 38], este modelo continua siendo una de las herramientas más utilizadas debido a su alta reproducibilidad, baja complejidad y bajo costo, y la gran versatilidad del procedimiento. El modelo puede otorgar diferentes

grados de lesión nigroestral produciendo distintos patrones temporales, dependiendo del sitio de la inyección y la dosis de la toxina [70]. Como se detallará más adelante (ver I.IX), este modelo también ha sido utilizado para el estudio de las alteraciones cognitivas relacionadas con la EP [71-74].

I.5. Síntomas no motores en la enfermedad de Parkinson

El estudio de los síntomas no motores asociados a la enfermedad de Parkinson (EP)(ver Tabla I.3) ha supuesto un gran avance para mejorar tanto el conocimiento clínico como fisiopatológico de la enfermedad. Los SNM de mayor relevancia son los trastornos del sueño; la disfunción autonómica; las alteraciones sensoriales; los trastornos neuropsiquiátricos y las alteraciones cognitivas [7, 75-77].

I.5.1. Trastornos del sueño

Numerosos estudios demuestran que la mayoría de los pacientes parkinsonianos presentan alteraciones del sueño y que estas se manifiestan usualmente en estadios tempranos de la enfermedad [6].

Pese a que la etiología de los trastornos del sueño es multifactorial, en la EP dicho trastorno se ha relacionado principalmente con alteraciones en el núcleo pedunculopontino, *locus coeruleus* , y en el núcleo retrorubral, todas ellas áreas involucradas con el control del sueño [78, 79].

De manera similar a la potencial utilización de las alteraciones del olfato y el estreñimiento como signos prodrómicos de la enfermedad, los trastornos del sueño también podrían ser potencialmente útiles como indicador que preceda a la aparición de los signos motores de la EP [80].

Tabla I.3. Síntomas no motores asociados a la enfermedad de Parkinson.**Trastornos del sueño**

Fragmentación del sueño
 Trastorno de conducta del sueño *REM*
 Síndrome de las piernas inquietas
 Somnolencia

Alteración autonómica

Estreñimiento
 Hipotensión ortostática
 Disfunción sexual
 Incontinencia urinaria

Alteraciones sensoriales

Alteraciones del olfato (hiposmia, cacosmia)
 Dolor
 Alteraciones visuales (diplopía, visión borrosa)

Trastornos neuropsiquiátricos

Depresión
 Apatía
 Ansiedad

Alteraciones cognitivas

Alteración de las funciones ejecutivas
 Déficit de memoria (de trabajo, episódica y de procedimiento)
 Trastorno de las habilidades visuoespaciales
 Déficit en fluencia verbal

Modificado de Chaudhuri y cols.[6]

I.5.2. Alteraciones autonómicas

De manera similar a las alteraciones del sueño, la disfunción autonómica es un SNM presente en todos los pacientes con EP, al menos en algún estadio de la enfermedad. La fisiopatología de este trastorno es compleja e incluye la degeneración y disfunción de los núcleos dorsal del vago, núcleo ambiguo y otros centros medulares que ejercen un control diferencial de las neuronas preganglionares simpáticas de la vía descendente [6].

Una de las alteraciones autonómicas más importante es el estreñimiento, siendo uno de los SNM más comunes en la EP. Además, como con los trastornos del sueño (ver

I.5.1), el estreñimiento puede preceder a la aparición de los síntomas motores [81, 82]. Se sospecha que mecanismos no dopaminérgicos están involucrados en el desarrollo del estreñimiento, dada la falta de respuesta de este trastorno al tratamiento con levodopa o agonistas dopaminérgicos [6].

Otras alteraciones autonómicas que pueden estar presentes en los pacientes parkinsonianos son la disfagia, disfunción sexual, incontinencia urinaria e hipotensión ortostática [6].

I.5.3. Alteraciones sensoriales

Las alteraciones del olfato (ej. hiposmia) se presentan en el 90% de los pacientes con EP, y constituyen un potencial indicador preclínico de la enfermedad [6, 8, 83], dado que se manifiestan de forma temprana y su aparición es independiente tanto del estado motor como del estado cognitivo [7, 84].

En la EP, las bases fisiopatológicas de dicha alteración no se conocen con claridad [85]. Algunos autores sugieren que se debe a una degeneración no dopaminérgica del bulbo olfatorio y núcleos relacionados [8, 20]; sin embargo otros autores relacionan la hiposmia con la alteración dopaminérgica, aunque no de forma directa [84].

Por otra parte, otras alteraciones sensoriales como el dolor y los trastornos visuales (ej. visión borrosa, dificultad para leer y diplopía), también son frecuentes en la EP.

I.5.4. Trastornos neuropsiquiátricos

Las alteraciones de índole emocional que más frecuentemente se asocian a la EP son la depresión y la apatía [86-88].

En la EP, la depresión incluye síntomas típicos como la pérdida de interés o de placer (*i.e.* anhedonia) y otros que pueden presentarse de forma combinada como la pérdida de apetito, la disminución de la libido y la falta de energía [88]. Este trastorno presenta

una prevalencia estimada del 30 ó 40%, dependiendo de la población estudiada y del criterio diagnóstico utilizado [86, 89].

La complejidad de la base fisiopatológica de la depresión en la EP, radica en que existe una alteración no sólo dopaminérgica, sino también serotoninérgica y noradrenérgica [88]. Así, basándonos en la hipótesis de Braak [20], la degeneración del núcleo del Raphe y del *locus coeruleus* (LC) en el estadio 2 (Figura 1.2) podría justificar la depresión como síntoma prodrómico de la EP [6, 80, 90].

La apatía (*i.e.* falta de respuesta a los estímulos circundantes) es considerada un SNM independiente a la depresión [91], aunque pueden coexistir. Así, los síntomas de apatía en ausencia de depresión ocurren entre el 4% y el 30% (14% de prevalencia estimada), mientras que los pacientes apáticos que presentan además depresión y/o alteraciones cognitivas, constituyen del 12% al 47% [92, 93]. La apatía tiene una relación compleja con los trastornos cognitivos, especialmente con la disfunción ejecutiva [94].

Se postula que la fisiopatología de la apatía – junto con otros síntomas como la anhedonia y la fatiga – podría deberse a la degeneración neuronal en áreas que median una conducta motivada (*i.e.* áreas frontal-subcortical), o en centros de recompensa (proyecciones dopaminérgicas entre el área tegmental ventral y el núcleo accumbens) [95].

1.5.5. Alteraciones cognitivas

El deterioro cognitivo se presenta con alta frecuencia en los pacientes con EP, y afecta gravemente la calidad de vida de los mismos. Por ello, en los últimos años, gran parte de la investigación realizada sobre los trastornos no motores asociados a la EP se han centrado de manera significativa en el estudio de esta alteración.

De acuerdo a la enorme relevancia de estas alteraciones cognitivas y a la necesidad de tener nuevos y mejores modelos de estudio de las mismas, se profundizará a continuación en las descripción del perfil de deterioro cognitivo asociado a la EP : su

neuropatología y su tratamiento. Además, se abordarán en profundidad los modelos animales de cognición en la EP.

I.6. Deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson

En casi la totalidad de los pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) se observa un cierto grado de deterioro cognitivo[96]. Las manifestaciones clínicas de dicho déficit cognitivo se extienden desde el deterioro cognitivo leve (DCL) que puede observarse incluso en pacientes sin tratamiento y en fases iniciales de la enfermedad hasta la demencia global [97, 98]. La demencia global constituye el signo clínico característico de los estadios más tardíos de la EP, de hecho es reconocido que el riesgo de desarrollar demencia aumenta con la progresión de la enfermedad [99] y puede afectar al 80 % de los pacientes que son seguidos durante 20 años [100-103]. La edad es el principal factor de riesgo aunque también se han descrito otros factores que se asocian al desarrollo de la demencia , tales como la apatía [104] y las alucinaciones visuales [105]; y también factores genéticos como mutaciones en el gen GBA [106].

El concepto de DCL proviene del estudio de la enfermedad de Alzheimer e históricamente se ha entendido como aquella fase de transición entre el estado cognitivo normal y la demencia. Así, en el DCL existe afectación objetiva en uno o varios dominios cognitivos sin que dicha afectación repercuta en las actividades de la vida diaria del paciente [107]. En este sentido, en lo referente al estudio de la enfermedad de Alzheimer, el diagnóstico formal del DCL se ha estipulado como indicador de alta probabilidad de involución lineal progresiva hacia la demencia [107, 108]. La aplicación de este concepto en el contexto de la EP resulta más complejo, pudiendo llegar a ser discutible la utilidad del mismo como indicador de futura conversión a demencia en la EP. [109, 110].

Así, en la EP el DCL se considera como un síndrome definido por criterios clínicos, cognitivos y funcionales [111].

Estudios neuropsicológicos han demostrado que existe heterogeneidad dentro de los pacientes con DCL tanto en el número como en el tipo de funciones cognitivas afectadas [96, 102, 112, 113], encontrándose distintos perfiles de deterioro cognitivo tanto en la exploración basal como a lo largo de la evolución de la enfermedad (Figura I.4) [114, 115].

Entre los dominios cognitivos afectados se han hallado alteraciones en las funciones ejecutivas, en diferentes procesos mnésicos y atencionales, así como en la velocidad de procesamiento de la información visuoespacial [116-121], en tanto que el lenguaje es la función menos afectada [98].

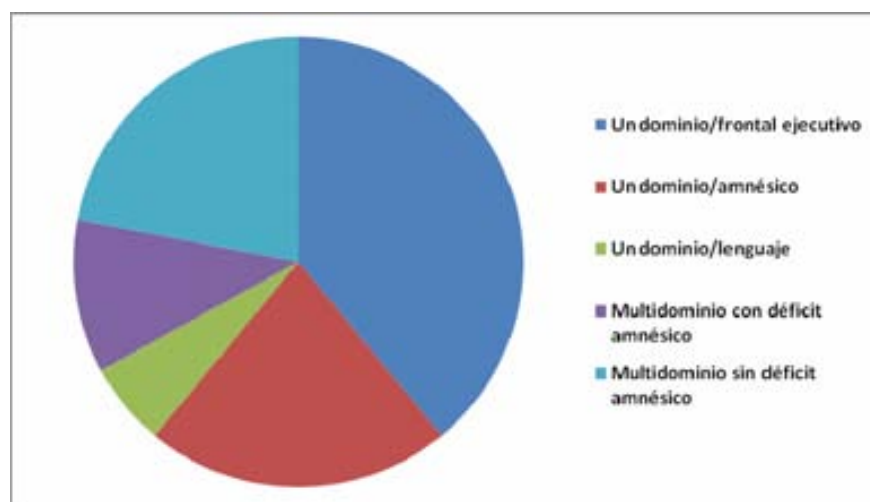


Figura I.4 Proporción relativa de los dominios cognitivos afectados en el DCL en la EP. Adaptado de [115]

I.6.1. Alteraciones ejecutivas

A pesar de la heterogeneidad cognitiva, el componente central del deterioro cognitivo en la EP está representado por la alteración de las funciones ejecutivas [117] desde sus fases iniciales y a lo largo de su proceso evolutivo [98, 122, 123].

En los pacientes con EP sin demencia se han descrito alteraciones en múltiples aspectos de la función ejecutiva, similares a los encontrados en pacientes con lesiones frontales [124, 125]. Dichas alteraciones se observan en la planificación, aprendizaje

de tareas, realización de tareas simultáneas, cambio de *set* intradimensional y extradimensional, cambio a las reglas mentales inversas, memoria de trabajo (i.e. almacenamiento de información no accesible en el entorno y conjunto de procesos que mantiene esta información accesible para su uso posterior) y atención específica [113, 126-131].

Los test neuropsicológicos que valoran las diferentes funciones ejecutivas se indican en la Tabla I.4 [132]

Tabla I.4: Déficits fronto-ejecutivos en la EP y tests neuropsicológicos para su valoración

TEST	FUNCIÓN EJECUTIVA
Span de dígitos hacia atrás	Atención selectiva /memoria de trabajo
<i>Trail-Making</i> parte B, <i>Wisconsin Card Sorting Test</i> (WCST)	Cambio de <i>set</i>
Test de Stroop	Inhibición de respuesta
WCST, tareas de torres (Hanoi, Londres)	Adquisición del <i>set</i> , elaboración de estrategias, y resolución de problemas
<i>Continuous performance test</i> (CPT), <i>Trail Making Test - A</i> (TMT-A)	Atención mantenida

Las tareas de cambio de *set* basadas en el test de Wisconsin Card Sort Test (WCST) proporcionan una medición cuantificable de la capacidad de los sujetos para “cambiar de una regla aprendida a otra” (Tabla I.4). Dichas tareas requieren la formación de un *set* o estrategia (cambio intradimensional, IDS) que debe ser luego cambiada por otra (cambio extradimensional, EDS). En la EP, la habilidad de adquirir el *set* atencional se encuentra preservada (IDS), en tanto que se observan errores en el EDS.

Las tareas ejecutivas que dependen de una mayor flexibilidad cognitiva (i.e. memoria de trabajo y las tareas de cambio de *set*) son las que se afectan de manera más precoz en la EP [133, 134], mientras que las tareas más dependientes de una correcta estabilidad cognitiva se afectan de manera más tardía [135]. Sin embargo, conforme

avanza la enfermedad, todas las funciones ejecutivas se ven afectadas y siguen un curso progresivo de deterioro.

En referencia a la topografía funcional de las funciones ejecutivas, diversos estudios funcionales han observado que las tareas de flexibilidad cognitiva se encuentran más localizadas a nivel del córtex prefrontal dorsolateral (CPF-DL) y ventrolateral (CPF-VL) [136, 137], mientras que la capacidad de resistir la interferencia depende de estructuras más mediales y basales como el córtex cingulado anterior (ACC) y el giro frontal medial [136, 138]

Por otra parte, se ha observado que las fluencias fonética y semántica se ven precozmente alteradas en la EP sin demencia. La fluencia fonética depende en gran parte de la integridad de las funciones ejecutivas, aunque sus correlatos neuronales están más íntimamente ligados con el conjunto de circuitos neuronales implicados en la expresión del lenguaje. Por otra parte la fluencia semántica depende del correcto funcionamiento de las funciones ejecutivas, la integridad anatómica o funcional de las estructuras temporales integradas dentro de los circuitos neuronales que conforman el sistema de la memoria semántica es igualmente necesaria, y específica para este tipo de fluencia verbal [139].

El grado de afectación de las fluencias fonética y semántica es similar en la EP sin demencia, pero de mayor intensidad al observado en la enfermedad de Alzheimer para el mismo grado de funcionamiento cognitivo global [140].

I.6.2. Memoria

En las fases iniciales de la EP, el patrón de déficits mnésicos es heterogeneo e incluye déficits en tareas de memoria de evocación libre, con relativa preservación de la memoria de reconocimiento y baja presencia de errores de intrusión [112, 141].

En la EP sin demencia los déficits mnésicos son principalmente una consecuencia del síndrome disejecutivo, que dificulta la correcta codificación del material presentado, la

elaboración de nuevas estrategias para aprender la nueva información, y la recuperación eficiente del material que ha llegado a ser almacenado a nivel temporal (*'retrieval defects'*) [140].

En la transición hacia la demencia, el patrón mnésico de la EP se modifica y va adquiriendo de manera paulatina un perfil más similar al de la enfermedad de Alzheimer, con mayor alteración de la memoria de reconocimiento y presencia de errores de intrusión [142].

I.6.3 Habilidades visuoespaciales

En la EP, los pacientes también presentan de manera relativamente precoz deterioro de las funciones visuoespaciales (se afectan de manera global prácticamente todas las funciones visuoperceptivas) que sigue un curso paralelo al deterioro de la función cognitiva global.

Las funciones visuoespaciales dependen de dos vías funcionales principales: (1) La vía occipito-temporal, que se encarga de la percepción de formas y colores y de la identificación de personas y objetos, y (2) la vía occipito-parietal, que se encarga de la percepción del movimiento, la orientación y rotación mental de objetos, la percepción de figuras superpuestas y las relaciones espaciales.

La disfunción visuoespacial en los pacientes parkinsonianos incluye alteraciones en tareas como la orientación de líneas [103, 143], reconocimiento facial [144], memoria espacial [145] y construcción de bloques y copia de figuras [146].

I.7 Bases fisiopatológicas del deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson

Pese a que la fisiopatología del deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson (EP) no se conoce con claridad [80], la disminución de dopamina (DA) parece estar relacionada con las alteraciones cognitivas de los estadios iniciales de la enfermedad. Sin embargo, la eficacia sólo parcial e incompleta de las terapias dopaminérgicas sugiere la contribución de otros neurotransmisores que también se encuentran alterados en la enfermedad y que también estarían involucrados en la progresión del deterioro cognitivo [126, 147].

Mientras que la disfunción fronto-ejecutiva parece ser consecuencia directa de la disregulación dopaminérgica [126], las alteraciones mnésicas y visuoperceptivas podrían asociarse a una disfunción colinérgica y a la presencia temporo-parietal de placas y Cuerpos de Lewy (CL) [96]. Además, los déficits noradrenérgicos y serotoninérgicos también presentes en la EP, podrían contribuir a las deficiencias y fluctuaciones atencionales y emocionales, respectivamente [118].

En relación a las alteraciones ejecutivas en la EP, diversos estudios han evidenciado que las mismas son consecuencia de la disfunción de diferentes áreas de la corteza prefrontal (CPF), las cuales conectan con los ganglios basales a través de los circuitos cortical-subcortical [148, 149].

Puesto que la pérdida neuronal en la SNpc es más marcada en la parte lateral (*i.e.* sitio de origen de la vía dopaminérgica meso-estriatal), y dada la somatotopía de las proyecciones nigroestriadas, la depleción dopaminérgica es mayor en el estriado dorso-lateral. Así, en las fases iniciales de la EP los déficits dopaminérgicos de ésta región del estriado (*i.e.* región que conecta con la CPF dorso-lateral; CPF-DL), se consideran responsables de las disfunciones ejecutivas como la memoria de trabajo y el cambio de *set* [137, 150, 151] (ver I.6.1).

Como la parte más lateral de la SNpc degenera antes que el área tegmental ventral (VTA, del inglés *ventral tegmental area*)[‡], es posible comprender por qué en fases precoces de la EP los déficits frontales que se detectan son más dependientes del CPF-DL, mientras que los dependientes del CPF-VL se afectan posteriormente [152].

La DA meso-cortical ejerce su efecto en la actividad neural de la CPF a través de los diferentes subtipos de receptores [153]. En concreto, diversos estudios han demostrado que tanto la familia de receptores dopaminérgicos DrD1 (al cual pertenecen DrD1 y DrD5), como la familia DrD2 (formado por DrD2, DrD3 y DrD4), están implicados en la funcionalidad del circuito de la memoria trabajo y otras funciones ejecutivas [149, 154-156].

Diversos estudios en animales, han evidenciado que la actividad de los receptores DrD1 en la CPF es fundamental en la memoria de trabajo [157-159], en tanto que la cooperación de los receptores DrD1 y DrD2 es necesaria para la mediación de la flexibilidad cognitiva [160].

Así, en la CPF existiría un equilibrio entre los receptores DrD1 y DrD2 que repercutiría sobre la neuromodulación de la DA en los procesos cognitivos regulados por la CPF [157].

La toma de decisiones parece estar relacionada con la actividad de los receptores DrD4, mientras que la función de los receptores DrD3 en la CPF aún está por esclarecerse [160].

[‡] Región que conecta por un lado con el estriado ventral y la CPF orbito-frontal, y por el otro lado conecta directamente con la CPF ventro-lateral; CPF-VL.

Por otra parte, los déficits colinérgicos corticales de la EP, presentes tanto en la corteza frontal, temporal, parietal y occipital son consecuencia del déficit de inervación colinérgica proveniente de los núcleos de la base cerebral, formados por el núcleo basal de Meynert (NbM) y el núcleo septal medial [149, 161]. Un deterioro colinérgico presináptico a nivel de estos núcleos, repercute directamente con déficits neuropsicológicos tales como la memoria de libre recuerdo y las habilidades visuoespaciales. Así, mientras la DA está más implicada en los defectos cognitivos fronto-estriatales, los déficits colinérgicos podrían explicar la alteración de la memoria y problemas visuoespaciales de la EP [162, 163].

En definitiva podríamos decir que el deterioro cognitivo asociado a la EP se explica por la co-existencia de al menos dos patrones de involución, que se diferencian entre un deterioro relativamente lento (en el que predominan déficits fronto-estriatales), y un deterioro más rápido (déficit cortical posterior). Ambos tipos de deterioro poseen diferentes sustratos fisiopatológicos, características genéticas, prognosis y respuesta a fármacos utilizados en el tratamiento de los signos motores de EP [112].

I.8. Tratamiento y cognición

El tratamiento de elección para la EP es la levodopamina (L-3,4 dihidroxifenilalanina; L-DOPA), en combinación con el inhibidor de la dopa descarboxilasa (benserazida o carbidopa), siendo el tratamiento más efectivo para los síntomas motores [4]. Sin embargo, el tratamiento crónico con L-DOPA se asocia con el desarrollo de eventos no deseados relacionados con la progresión de la enfermedad como fluctuaciones motoras, discinesias y problemas neuropsiquiátricos. Conforme avanza la enfermedad, la falta de respuesta a la L-DOPA conlleva a síntomas como disfunciones autonómicas, inestabilidad postural y eventualmente deterioro cognitivo.

Los efectos del tratamiento con L-DOPA sobre las funciones cognitivas son complejas y variadas [164], y su efecto diferencial depende del estadio de la enfermedad, del *estatus* motor del paciente así como del dominio cognitivo valorado [112].

Los estudios realizados sobre función ejecutiva son los que más han puesto de manifiesto el efecto dual de la L-DOPA sobre la función cognitiva. Según el tipo de paciente y la función explorada, se ha observado que la estimulación dopaminérgica (*i.e.* L-DOPA o agonistas dopaminérgicos como pramipexol o pergolide) es capaz de empeorar [165, 166], mejorar [167-170] o no modificar las funciones ejecutivas [171, 172].

En estadios tempranos, y principalmente en pacientes "*de novo*", la terapia de reemplazo dopaminérgico mejora las funciones ejecutivas [168] [169]. Durante estadios intermedios los agentes dopaminérgicos no modifican significativamente la cognición [169], y cuando la dopamina (DA) es administrada a pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad, los efectos agudos de la L-DOPA pueden empeorar algunas funciones cognitivas de tipo frontal ya que estos pacientes no pueden amortiguar el exceso de DA proveniente de la L-DOPA (principalmente aquellos que presentan fluctuaciones motoras *on-off*) [131].

Estos efectos dispares pueden ser explicados por la progresión de la enfermedad y de la respuesta específica del paciente a la L-DOPA [127] ó por el diferente efecto de la misma sobre funciones corticales que estarían mediadas por estructuras neurales con distinto grado de depleción dopaminérgica. Con ello, los efectos diferenciales de la L-DOPA podrían reflejar la progresión temporo-espacial de la depleción dopaminérgica en pacientes con EP [164].

Como se ha mencionado en I.7, la región dorsal del estriado, y consecuentemente sus proyecciones, se encuentran muy afectadas en los estadios tempranos de la EP. Contrariamente, la región ventral del estriado puede mantenerse relativamente preservada hasta bien llegados los estadios más avanzados de la enfermedad [173]. Ello implica que el inicio de la terapia de reemplazo dopaminérgico suponga una

relativa mejoría sobre las funciones dependientes de las regiones afectadas (ej. planificación) al restituir los niveles óptimos de dopamina. Contrariamente, la sobreestimulación de las porciones no afectadas (ej. estriado ventral, vía mesolímbica) induce alteraciones mediadas por la sobredosis dopaminérgica en procesos cognitivos relacionados con dichas regiones (ej. toma de decisiones) [131, 169, 174, 175].

Esta respuesta paradójica dependiente de la relación entre la estimulación dopaminérgica y la integridad de los circuitos fronto-subcorticales constituye el conocido modelo de U invertida [131, 169, 174, 175].

Este modelo nos explica la frágil relación entre niveles óptimos de dopamina y cognición y nos permite discernir entre aquellas alteraciones cognitivas propias del proceso neurodegenerativo de aquellas propiciadas por el efecto disociado del tratamiento farmacológico de restitución dopaminérgica .

Con todo lo anterior, el reemplazo dopaminérgico central (ya sea por administración de L-DOPA o agonistas dopaminérgicos) produciría una mejoría incompleta de la función cognitiva en la EP, ya que a la mejoría inicial (estabilizada en los primeros años), le sigue un deterioro progresivo conforme avanza la enfermedad [127] (Figura 1.5), evidenciando que el reemplazo dopaminérgico es incapaz de compensar todos los déficits cognitivos observados en la EP [149].

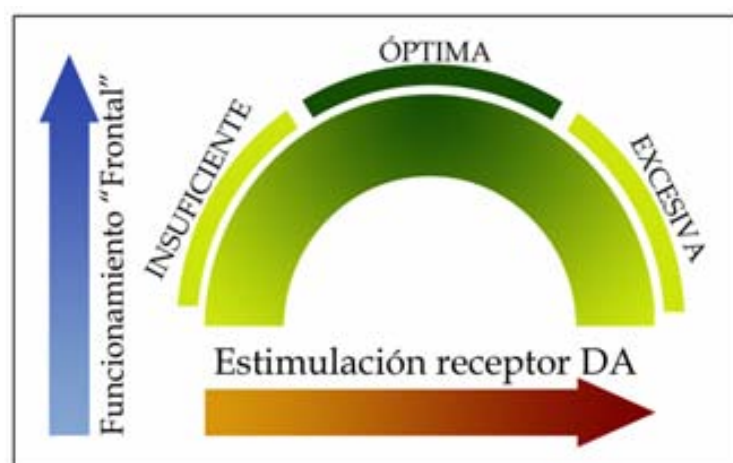


Figura 1.5: Efecto del reemplazo dopaminérgico sobre las funciones cognitivas en la EP. DA : dopamina. Adaptado de [127].

Cabe mencionar que existen otros mecanismos no dopaminérgicos que explican la afectación progresiva y la extensión del déficit a otros dominios y funciones cognitivas más allá de los dependientes de los circuitos fronto-estriatales [171, 172] (ver I.7.). Así, los sistemas dopaminérgicos y colinérgicos estriatales y corticales en EP están comprometidos de manera opuesta [149]. El bajo tono dopaminérgico en el estriado probablemente se acompaña por un aumento de transmisión colinérgica [149], y por lo tanto, las funciones motoras de los pacientes mejora con fármacos anticolinérgicos (*i.e.* bloqueantes de receptores de acetilcolina). Este efecto se asocia a la compensación de la disminución del tono dopaminérgico sobre las interneuronas colinérgicas del estriado [176]. En contrapartida, las funciones cognitivas dependientes de la neurotransmisión colinérgica se verían afectadas por dichos fármacos [149]. Así, los agentes anticolinérgicos inducen alteraciones en los dominios cognitivos como la memoria y el rendimiento cognitivo dependiente del lóbulo frontal [177], hecho que explica el síndrome disejecutivo transitorio inducido por el tratamiento con escopolamina, un antagonista muscarínico.

Por otra parte, el tono colinérgico en la corteza disminuye como consecuencia de la degeneración del núcleo basal de Meynert, en tanto que las aferencias dopaminérgicas provenientes del área tegmental ventral (VTA) aún están preservadas [149]. Este desequilibrio dopamina/acetilcolina cortical probablemente explica los efectos beneficiosos de los inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento de la demencia asociada a la EP. De hecho, diversos fármacos como el donepecilo [178], rivastagmina [179], y galantamina [180] han sido ensayados para valorar su eficacia en la función cognitiva en esta etapa, observándose una mejora no sólo en la atención y ciertas funciones cognitivas, sino también en síntomas neuropsiquiátricos.

I.9. Estudio del deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson mediante el uso de modelos de parkinsonismo en roedores

Durante años los modelos de parkinsonismo en roedores se han basado en la generación de los síntomas motores de la enfermedad y su correlación con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc [181]. Sin embargo, en la última década varios grupos de investigación se han centrado en el estudio de los síntomas no motores (SNM) de la enfermedad de Parkinson (EP), en especial en el deterioro cognitivo, mediante el uso de algunos de los modelos animales descritos anteriormente en I.4 [181].

En general, a la hora de abordar el estudio de la función cognitiva utilizando modelos animales se han de tener presente las siguientes consideraciones:

- i) Al evaluar una forma de memoria en particular, otros tipos de memoria pueden interferir en la interpretación de los resultados.
- ii) Realizar más de una prueba cognitiva para la correcta valoración de la afectación de un dominio cognitivo.
- iii) La posible interferencia en los resultados de las alteraciones motoras características de los modelos de parkinsonismo .
- iv) En las tareas que utilizan olores como estímulos discriminativos, ser cautelosos a la hora de interpretar los tests, puesto que se ha demostrado alteración en la función olfatoria en diferentes modelos de parkinsonismo [48, 182]

Con todo lo anterior, la manera más adecuada para diseñar una serie de tests cognitivos en roedores es elegir diversas tareas que requieran habilidades tanto sensoriales como motoras [183].

Por otra parte es importante el “orden” en que se realizan las pruebas. Algunos tests de comportamiento implican privación de comida o penalizaciones que pueden producir un cierto grado de estrés al animal, por lo que dichos tests se han de realizar en último lugar.

A continuación se describen las pruebas que con mayor frecuencia se utilizan con roedores con la finalidad de evaluar alteraciones cognitivas, tanto ejecutivas como mnésicas.

I.9.1. Funciones ejecutivas

Para el estudio de las funciones ejecutivas en roedores, los test conductuales ampliamente utilizados son el laberinto radial [184], el laberinto de agua de Morris [185], los laberintos en T [183], la prueba de cambio de set atencional [186] y el test del tiempo de reacción a cinco elecciones seriales [187]

I.9.1.1.Laberinto de Morris

Es uno de los test más empleados en el estudio de la memoria espacial en ratas y ratones. En este laberinto los animales tienen que nadar para localizar una plataforma oculta. Metodológicamente, este paradigma resulta de especial interés, ya que no necesita privación de comida, ni de la aplicación de una penalización física para motivar la conducta del animal.

I.9.1.2.Laberinto en T

En este test se evalúa la alternancia demorada, considerada una tarea de memoria de trabajo, e incluye componentes de reglas de aprendizaje y navegación espacial [183].

La ejecución de esta prueba permite definir el síndrome prefrontal, puesto que la correcta realización por parte del animal depende de la integridad del circuito frontoestriatal [188].

I.9.1.3.Laberinto radial

Este laberinto es utilizado principalmente en ratas y contrariamente al laberinto de Morris, requiere someter al animal a una restricción de comida (ver M.3.3).

La combinación de la capacidad para seguir un evento y la recuperación instantánea de la información sobre dicho evento constituye la memoria de trabajo. Así en el laberinto radial los animales requieren de esta memoria puesto que deberán retener información para completar la tarea sin cometer ningún error. Se considera error volver a entrar a un brazo ya visitado (EMT) (ver M.3.3).

La utilización de los laberintos, mediante el desarrollo de protocolos experimentales adecuados, ha permitido evaluar diferentes formas de memoria que pueden estar particularmente afectadas, dependiendo de las estructuras cerebrales dañadas, tales como el estriado dorsal [189], el hipocampo, la corteza entorrinal ó la corteza perirrinal [190, 191].

I.9.1.4. Prueba de cambio de set atencional

Esta prueba se considera análoga al *Wisconsin Card Sort Test* (WCST) realizada en humanos [186, 192]. Este test consiste en cuatro etapas consecutivas [*i.e.* discriminación simple, (SD); discriminación compuesta, (CD); discriminación intradimensional, (ID) y discriminación extradimensional, (ED)]. En estas etapas se valoran varios aspectos de la función ejecutiva como la atención, flexibilidad cognitiva y estrategia de aprendizaje (*i.e.* asimilación de las reglas de adquisición) [193]. Además, en este paradigma se puede incluir la condición de aprendizaje de inversión realizada con posterioridad a la discriminación ID y/o ED (ver M.3.7) [183, 194].

En la ejecución de esta prueba existe una contribución diferencial de las zonas de la corteza prefrontal [193]. Mientras que la región ventral de la corteza prefrontal medial (mCPF; zona de la corteza prefrontal análoga a la corteza prefrontal dorsolateral en humanos) está implicada en el cambio extradimensional (EDS)[186, 192], la corteza

orbitofrontal es crítica en el aprendizaje de inversión [195, 196], y la corteza cingulada anterior y posterior son claves para el cambio intradimensional (IDS)[193].

I.9.1.5. Test del tiempo de reacción a cinco elecciones seriales (*five choice serial reaction time task*)

Esta prueba de comportamiento evalúa la atención del animal.[197]. En este test, el animal debe prestar atención a la luz que se enciende en uno de cinco agujeros posibles, tras lo cual ha de meter la cabeza en el agujero de la luz encendida para obtener una recompensa en forma de comida [198]. Esta prueba se puede hacer más compleja cuanto más reduzcamos el intervalo de tiempo de encendido de la luz, lo que obliga al animal a estar más atento a dicha señal.

Esta prueba permite evaluar otros parámetros diferentes a las tareas prefrontales, tales como las respuestas prematuras, cuyo análisis representa un índice de impulsividad [198]. La aplicación práctica de este paradigma se realiza principalmente en ratas, aunque también puede adaptarse a ratones [199].

I.9.2. Aprendizaje y memoria

I.9.2.1. Prueba de reconocimiento de objetos nuevos

Esta prueba valora la memoria de reconocimiento y se fundamenta en la tendencia natural de los roedores a explorar nuevos objetos y ambientes, y compararlos con otros que les son familiares. Así, al exponer al animal a una serie de objetos se mide el tiempo de exploración, definido como el período durante el cual el animal olisquea o toca el objeto con las patas delanteras (ver M.3.4). En los animales sin deterioro cognitivo se espera mayores tiempos de exploración de los objetos nuevos.

Se ha demostrado en roedores que la memoria de reconocimiento está en parte mediada por la corteza prefrontal, que ejercería el control de procesos cognitivos integrados en otras áreas encargadas de procesar el reconocimiento visual de los objetos (corteza perirrinal y entorrinal) [200].

I.9.2.2. Pruebas de evitación pasiva y activa

Estos tests se basan en el procedimiento condicionado clásico que evalúa el aprendizaje asociativo[201].

La prueba de evitación pasiva permite estudiar el aprendizaje adquirido y la memoria. Es una prueba unidireccional donde al animal se le condiciona con un estímulo aversivo y posteriormente se valora si recuerda esa experiencia en una sola sesión [202].

La prueba de evitación activa, a diferencia de la anterior requiere varias sesiones de aprendizaje, permitiendo examinar funciones cognitivas complejas y valorar la adquisición y consolidación de la memoria en un mismo animal durante el experimento [202].

La respuesta a los estímulos de evitación, ya sea pasiva o activa, están mediados por la amígdala basolateral, hipocampo, mCPF, corteza cingulada anterior y núcleo acumbens [203].

I.9.2.3. Prueba de reconocimiento social

Esta tarea se centra en el grado de familiaridad entre dos individuos. Los ratones con una función cognitiva no deteriorada pasarán más tiempo olisqueando a los ratones nuevos que a los familiares; en contrapartida los que tengan un déficit cognitivo no serán capaces de distinguir entre los ratones familiares y los nuevos, por lo que su tiempo de exploración será similar en ambos grupos. La memoria de reconocimiento social está considerada como un modelo de memoria olfatoria y de memoria de trabajo a corto plazo basada en las habilidades de los roedores para discriminar diferentes

olores [204]. El reconocimiento social está principalmente mediado por el cortex entorrinal, subiculum ventral y el órgano vomeronasal [205]; y se ve también afectado por las lesiones en hipocampo y septum y también por la edad [206].

I.9.3. Estudio del deterioro cognitivo en modelos genéticos de la enfermedad de Parkinson

A excepción de los diferentes tipos de modelos que sobreexpresan alfa-sinucleína (α -Syn), existen pocos trabajos que utilizan modelos genéticos para el estudio del deterioro cognitivo en la EP [207, 208]. Zhu y col demostraron que ratones deficientes en Parkina exhibían alteración del aprendizaje espacial en el paradigma del laberinto de Morris sin presentar alteración motora aparente [207]. Dicha alteración cognitiva fue atribuida a una alteración del metabolismo de dopamina (DA) estriatal [207].

Otros grupos observaron que los ratones *knockout* para DJ-1 presentaban déficits en la memoria de reconocimiento de objetos, dato que correlacionaron con una reducción del número de células TH positivas en el área tegmental ventral (VTA) [208].

Por otra parte varias líneas de ratones transgénicos sobreexpresando α -syn han sido utilizados para evaluar un potencial deterioro cognitivo. Se demostró que ratones que sobreexpresan α -syn bajo el control del promotor Thy-1 muestran alteración tanto en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos como en el aprendizaje por inversión. Estos hallazgos fueron relacionados con cambios en los niveles extracelulares tanto de DA como de acetilcolina [182].

Recientemente, se ha demostrado que ratones *knockout* para el factor de transcripción mitocondrial (Tfam[‡]) de neuronas dopaminérgicas (modelo llamado “MitoPARK”)[209], presentan alteraciones cognitivas premotoras.

[‡] proteína necesaria para la regulación del número de copias del DNA mitocondrial y su mantenimiento [210]

El modelo MitoPark presenta una disminución de la expresión de DNA mitocondrial y alteración de la cadena respiratoria de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, provocando una alteración motora progresiva, presencia de inclusiones intraneuronales y una muerte neuronal dopaminérgica más pronunciada en SNpc cuando se compara con el VTA [211].

Li y cols. [209], evaluaron también en este modelo murino el aprendizaje y la memoria espacial evaluada mediante el laberinto de Barnes (tarea dependiente del hipocampo) y mediante el test de reconocimiento de objetos nuevos previo a la aparición de alteraciones motoras. Así, en el laberinto de Barnes los ratones MitoPark mostraron alteraciones en la fase de adquisición (aprendizaje) sin alteraciones en la fase de retención (memoria). Además, estos animales presentaron alteraciones en la prueba de reconocimientos de objetos nuevos [209].

Si bien este ratón *knockout* se perfila como un prometedor nuevo modelo murino pre-motor de parkinsonismo, ya que presenta algunas de las alteraciones cognitivas que preceden a las alteraciones motoras en la EP, aún es necesario realizar tests de comportamiento adicionales y específicos de tareas frontal-estriatales para afirmar que el modelo MitoPark reproduce las alteraciones cognitivas observadas en las etapas iniciales de la EP.

1.9.4. El modelo de MPTP utilizado en el estudio del deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Parkinson

Con este fin , el modelo de MPTP se ha estudiado en ratón [212, 213] y en rata [48, 204, 214].

Deguil y cols [213], demostraron que ratones tratados de manera crónica con MPTP presentaban alteraciones en la memoria de trabajo evaluada en el laberinto de Morris. Dichos animales mostraron una reducción del 50% en el número de neuronas TH positivas en la SNpc.

Otro estudio utilizando el modelo agudo de MPTP en ratón relacionó una reducción de la proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII) en el hipocampo, con una alteración de la memoria de reconocimiento de objetos nuevos [215].

Por otra parte, Braga y cols [216], observaron que ratas lesionadas mediante la inyección bilateral de MPTP en SNpc mostraban dificultad en la alternancia demorada evaluada en el laberinto en T.

La administración intranasal de MPTP en rata, evidenció que los animales presentaban alteración de la memoria de trabajo en la tarea de reconocimiento social [204].

I.9.5. Utilización del modelo de 6-OHDA para el estudio del deterioro cognitivo en la enfermedad de Parkinson

En el modelo de lesión unilateral con 6-OHDA, si bien se han podido modelar ciertos aspectos del deterioro cognitivo de la EP [217-219], siempre se ha considerado que la posible presencia de alteraciones motoras podrían interferir en la evaluación del comportamiento de los animales [183]. Además, la posible compensación del hemisferio no lesionado podría enmascarar las deficiencias cognitivas producto de la denervación ocasionada por la lesión [183].

Pese a ello, los trabajos relacionados con el deterioro cognitivo en este modelo unilateral de lesión dopaminérgica se han focalizado en la valoración del déficit atencional. Algunos autores observaron una disminución en la respuesta hacia el lado contralateral en el test de tiempo de reacción a cinco elecciones seriales [220, 221].

En relación al modelo bilateral de lesión dopaminérgica inducido por 6-OHDA, el alto grado de plasticidad de las neuronas dopaminérgicas residuales generan una pronunciada recuperación que podría comprometer el uso del modelo bilateral de 6-OHDA en estudios de larga duración [222]. Además, la lesión bilateral genera alta mortalidad debido a la presencia de afagia y adipsia (ver I.4.3.3).

Pese a ello, diversos grupos han utilizado este modelo para el estudio de alteraciones cognitivas en la EP realizando la lesión bilateral en estriado [71-74].

Sin embargo, existen ciertas discrepancias a la hora de evaluar la memoria de trabajo. Mientras algunos investigadores observaron alteraciones en dicha tarea en ratas con lesión bilateral en estriado dorsal [73] y con lesión bilateral en SNpc [214] otros grupos fueron incapaces de reproducir dichas observaciones [71].

En la valoración de otras funciones ejecutivas como la atención, se demostró que ratas con lesión bilateral en el estriado dorsal presentaban alteraciones en el test de tiempo de reacción a cinco elecciones seriales [223].

Finalmente, queda de manifiesto que los modelos actuales de parkinsonismo que han sido ampliamente utilizados para el estudio de las alteraciones motoras de esta enfermedad, también podrían ser útiles (teniendo en cuenta sus correspondientes limitaciones) para el estudio de los diversos aspectos del deterioro cognitivo asociado a la EP

En este sentido aún queda por aclarar en estos modelos animales cuáles dominios cognitivos alterados por depleción dopaminérgica son los que más se aproximan a los observados en los diferentes estadios de la EP en humanos. Para ello, es necesario diseccionar el papel de la regulación dopaminérgica en los diferentes dominios cognitivos alterados en la EP, dada la importancia clínica que este aspecto de la enfermedad ha ido adquiriendo en los últimos años.

Respecto a esto último, la elección de un modelo de estudio válido es tan importante como la elección de las tareas de comportamiento elegidas para el estudio diferencial de los dominios cognitivos comprometidos en las distintas etapas de la enfermedad.

De acuerdo a todo lo anteriormente descrito y tal como se detallará en los capítulos posteriores, el presente trabajo pretende realizar la caracterización molecular y determinar el perfil cognitivo tanto de modelos de parkinsonismo pre-establecidos,

como de nuevos modelos animales que contemplen diferentes grados de denervación dopaminérgica que se aproximen mejor a lo observado en humanos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Según se ha visto en la Introducción precedente, el deterioro cognitivo es uno de los principales síntomas no motores de la enfermedad de Parkinson y repercute de forma sustancial a la calidad de vida del paciente.

Durante el transcurso de la enfermedad se observa la co-existencia de al menos dos patrones de deterioro cognitivo con diferentes sustratos fisiopatológicos, características genéticas, prognosis y respuesta a fármacos utilizados comúnmente en la clínica de la EP.

Por lo expuesto resulta esencial desarrollar modelos animales representativos de las etapas cognitivas de la enfermedad, capaces de reproducir características similares a las observadas en pacientes con EP.

Por tanto, la **hipótesis principal** del presente trabajo se ha centrado en que los modelos con diferente grado de degeneración dopaminérgica inducida por la inyección en el haz prosencefálico medial (*i.e* MFB) de la neurotoxina 6-OHDA pueden constituir una herramienta para el estudio de las alteraciones cognitivas fronto-estriatales asociadas a la disfunción mayoritariamente dopaminérgica de las primeras fases de deterioro cognitivo en la EP. Con ello, podrían ser de utilidad para una posterior instauración de nuevas terapias o complementarias a las actuales y así abordar un espectro mayor de síntomas asociados a la EP, además de los motores.

De acuerdo a lo anterior, se establecieron los siguientes **objetivos**:

1. Reproducir modelos de lesión dopaminérgica unilateral (*i.e.* lesión sólo en MFB de un hemisferio).

2. Generar y validar un modelo de lesión dopaminérgica bilateral (i.e. lesión en MFB de ambos hemisferios). Las dosis de neurotoxina inyectada no será la misma para ambos hemisferios con el objetivo de lograr una degeneración asimétrica.

3. Analizar si en ambos modelos las lesiones dopaminérgicas repercuten selectivamente en la ejecución de diversas tareas cognitivas que permitan diferenciar la implicación de un determinado circuito neuronal en la ejecución de las mismas. En concreto, se valorarán las funciones ejecutivas y habilidades mnésicas. Complementariamente, se analizarán otros síntomas no motores que podrían interferir en la ejecución de las tareas mencionadas anteriormente. Para ello estudiaremos en estos modelos animales las habilidades olfatorias, así como el grado de anhedonia.

4. Estudiar el comportamiento del animal en las tareas analizadas en respuesta al tratamiento con L-DOPA a diferentes dosis.

5. Valorar las modificaciones moleculares ocurridas como consecuencia de la lesión dopaminérgica y del tratamiento. Para llevar a cabo este objetivo se realizarán técnicas de inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa y el transportador de dopamina en diferentes regiones del cerebro. Se estudiarán los niveles de catecolaminas en el cuerpo estriado y corteza prefrontal mediante la técnica de cromatografía líquida de alta definición con columna de fase reversa. También se analizará la expresión de los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos en la corteza prefrontal mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

M.1. Animales de experimentación

Para todos los trabajos experimentales se utilizaron ratas macho Wistar (Charles River Lab., Francia) de 150-175 grs al comienzo de cada protocolo realizado.

Los animales se mantuvieron en grupos de tres animales por jaula en una habitación con temperatura y humedad controlada (*i.e.* 22°C y 50-55% de humedad relativa), y fotoperiodo luz/oscuridad de 12/12hrs (20:00 hrs comienzo de la fase de oscuridad) con libre acceso a agua y pienso comercial para roedores (SAFE, PanLAB, Barcelona, España) , excepto en el período de dieta, si lo requiere el protocolo a realizar.

Los estudios de conducta se realizaron en cámaras de comportamiento diseñadas y equipadas con las condiciones necesarias para la realización de dichas pruebas. Estos recintos están cerrados y preservan las mismas condiciones ambientales presentes en el mantenimiento de los animales. Durante el desarrollo de las pruebas experimentales el nivel de ruido se mantuvo constante para filtrar al máximo los sonidos externos que pudieran desviar la atención de los animales.

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigación del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa europea (86/609/EEC) del 24 de Noviembre de 1986 para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

M.2. Lesión dopaminérgica unilateral mediante la inyección de 6- OHDA en el MFB y verificación de la lesión *in vivo*

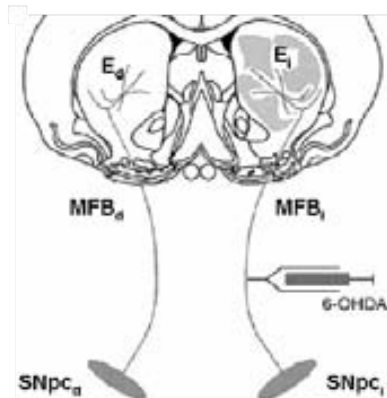
Previo a la anestesia con medetomidina (0.5 mg/kg) y ketamina (75 mg/kg), los animales fueron pretratados con desipramina (25 mg/kg i.p.; Sigma) para preservar las neuronas noradrenérgicas.

Se constató que el animal alcanzara un grado de analgesia adecuado para realizar la intervención quirúrgica, mediante la evaluación de la ausencia de los reflejos flexor,

pupilar y la respuesta ante la estimulación dolorosa en la porción más caudal de la cola .

La lesión dopaminérgica mediante inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) se realizó colocando los animales con la cabeza rasurada en un marco estereotáxico David Kopf (PanLAB, Barcelona, España) con la barra de los incisivos situada a -2,3 mm respecto a la línea interauricular (Figura M.1). Tras abrir la piel se realizó un trépano en las coordenadas AP: -4,4mm, Lat: -1 mm respecto al bregma, y se profundizó 7,8 mm respecto a la duramadre para alcanzar el MFB, según el atlas de Patxinos [224]

A



B



Figura M.1: Lesión dopaminérgica unilateral por inyección de 6-OHDA en MFB. (A) Se muestra el diagrama de la vía nigroestriatal donde las áreas sombreadas en el estriado izquierdo indica la pérdida de dopamina debido a la inyección de 6-OHDA en MFB. Ed, estriado derecho; Ei, estriado izquierdo; MFBd, medial forebrain bundle derecho; MFBi, medial forebrain bundle izquierdo; 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; SNpcd, substantia nigra derecha; SNpci, substantia nigra izquierda. B) Utilización del marco estereotáxico David Kopf en ratona

La 6-OHDA (8µg base libre/4 µl, Sigma) fue preparada en suero salino al 0.9% con ácido ascórbico al 0.02%, y se mantuvo fría y protegida de la luz hasta ser inyectada con una jeringa Hamilton a una velocidad de 1 µl/min durante 4 minutos, manteniendo la aguja un minuto más antes de retirarla y así evitar el reflujo de la solución.

La administración del vehículo (*i.e.* solución salina de ácido ascórbico) en igual volumen y coordenadas permitió conformar el grupo de ratas SHAM.

Tras la intervención, se cerró la piel con puntos sueltos y se colocaron los animales en una jaula bajo una fuente de calor, hasta que despertaron de la anestesia.

Para medir el éxito de la lesión quirúrgica con 6-OHDA, y así poder seleccionar los animales correctamente denervados, tres semanas después de la lesión se evaluó la actividad rotatoria inducida por apomorfina (0.05 mg/kg subcutánea; Sigma)[225].

La conducta rotacional se registró mediante el empleo de un multicontador LE 3806 acoplado a sensores LE 902 (PanLAB, Barcelona, España) y se cuantificó la conducta de giro durante 60 min.

Previo a la inyección de apomorfina, los animales se colocaron en los recipientes (*bowl's test*) con la finalidad de aclimatarlos al nuevo recinto experimental. La prueba se repitió tres veces a intervalos de 48 hrs entre ellos [226].

Los animales que dieron más de 100 vueltas contralaterales a la lesión (*i.e.* en nuestro caso, hacia la derecha) durante 60 min en los dos últimos tests fueron seleccionados para continuar con el protocolo experimental [227].

A continuación y previo a los ensayos conductuales, los animales fueron sometidos a un período de “lavado de la apomorfina” durante siete días.

M.3. Evaluación del comportamiento cognitivo en modelo unilateral de parkinsonismo en rata inducido por 6-OHDA

Se evaluaron diferentes dominios cognitivos en los animales lesionados descritos en M.2 a través de la realización de varias pruebas de comportamiento incluidas en un diseño experimental común (M.3.1), salvo alguna modificación puntual (Figura M.2) .

M.3.1. Diseño experimental

En general, y para disponer de los datos basales de los animales que posteriormente fueron lesionados, el diseño experimental fue dividido en una etapa basal y una etapa post-lesión (*i.e.* antes ó después de la inyección de 6-OHDA ó vehículo). Ambas etapas incluyeron una fase de privación de comida, si la prueba así lo requería, y una fase de realización de la prueba de comportamiento, que a su vez incluyeron las fases de ambientación, entrenamiento y medición. Entre ambas etapas del diseño experimental se realiza la lesión con 6-OHDA, 21 días después se seleccionan los animales correctamente denervados (ver M.2), y tras 7 días de lavado de la apomorfina se continúa con la etapa post lesión del diseño experimental. Finalmente, los animales fueron sacrificados para verificar la lesión dopaminérgica a través de inmunohistoquímica (M.4).

Así, el esquema del diseño experimental fue el siguiente:

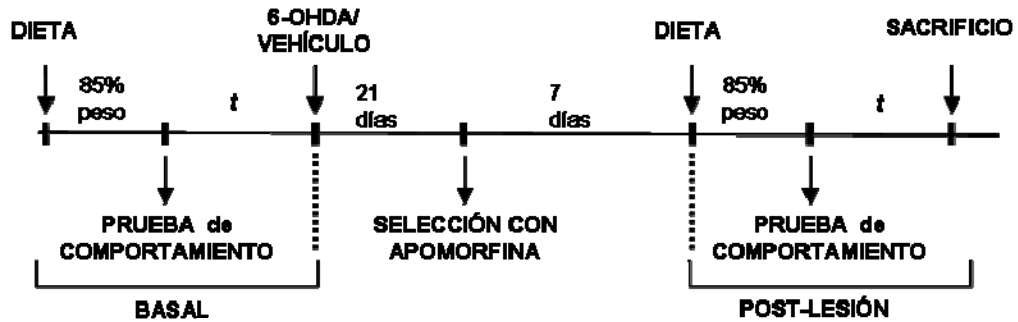


Figura M.2: *Diseño experimental en modelo unilateral inducido por 6-OHDA.* Se muestra esquemáticamente las etapas basal y post-lesión de los ensayos de comportamiento en ratas con inyección en MFB de 6-OHDA o vehículo. Entre ambas etapas se muestra la comprobación de la lesión mediante la actividad rotatoria inducida por apomorfina. Los tiempos “t” variarán en función de la prueba de comportamiento realizada.

Antes de comenzar con las pruebas de comportamiento los animales fueron manipulados por el experimentador durante varios días consecutivos con la finalidad de minimizar el estrés de los animales. También los animales fueron sometidos a un ensayo de exploración libre para favorecer la habituación de los roedores a las condiciones de la prueba. La manipulación previa, así como la exposición al contexto experimental, permiten controlar una serie de factores que afectan al aprendizaje de las tareas de memoria y que podrían enmascarar los resultados obtenidos.

M.3.2. Privación de comida

Previo al entrenamiento del correspondiente ensayo conductual, todas las ratas fueron sometidas a privación de comida (dieta de 15-20 grs de comida por día) hasta alcanzar el 85% de su peso inicial [218](Figura M.2).

El peso de cada rata fue comprobado diariamente, aproximadamente a la misma hora, y se corrigieron desviaciones en el peso deseado modificando la ración de comida entregada para ese día en particular.

M.3.3. Estudio de la memoria de trabajo en laberinto radial de ocho brazos

Para valorar la memoria de trabajo en los animales de experimentación se utilizó el laberinto radial de ocho brazos. El protocolo experimental utilizado se basa en la versión de Olton [184], tal y como se detalla a continuación.

M.3.3.1. APARATO:

El aparato consiste en un laberinto radial (Panlab, S.L., Barcelona, Spain) elevado a 90 cm del suelo, compuesto de ocho brazos idénticos de 60 cm de longitud y 10 cm de ancho, y una zona central octogonal de 30 cm de diámetro. La entrada desde la zona central a cada uno de los brazos está delimitada por puertas (que se elevan mediante un sistema de guillotinas ; Figura M.3).

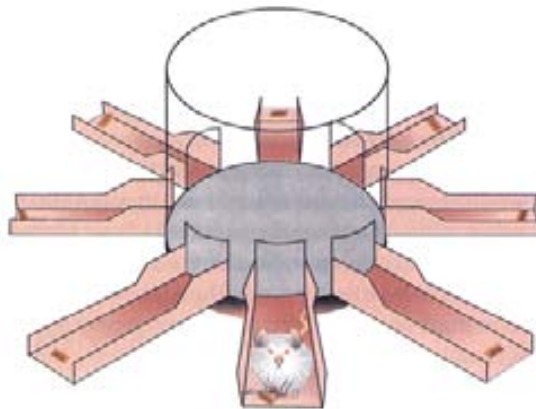


Figura M.3 : *Esquema del laberinto radial de ocho brazos.*

Procedimiento

M.3.3.2. FASE DE AMBIENTACIÓN:

Durante los dos primeros días se permitió a cada rata explorar el laberinto durante 10 min para adaptarlas a éste, primero de forma grupal (*i.e.* por jaula) y luego individualmente. Durante estas sesiones no se presentó comida como recompensa.

M.3.3.3. FASE DE ENTRENAMIENTO/EVALUACIÓN:

En esta fase y durante 9 días, todos los animales recibieron una sesión diaria donde al final de cada uno de los brazos se colocó una recompensa de comida (45 mg de sucrosa en gránulos; Bioserve). Dichos refuerzos no fueron reemplazados a lo largo de la sesión, por lo que cada sujeto tuvo acceso a un máximo de 8 piezas de comida.

Al comienzo de la sesión, cada rata fue ubicada en la plataforma central del aparato, y al cabo de 5 segundos todas las puertas de acceso a los brazos se abrieron.

Se registró la visita a cada brazo en el momento que el animal atravesó con sus 4 patas la puerta de acceso (LE 8300 con software SEDACOM v 1.3, Panlab, SL, Barcelona España).

La sesión finalizó cuando se cumplieron una de las siguientes condiciones: (i) el sujeto visitó los 8 brazos del laberinto, (ii) realizó 16 visitas, ó (iii) se cumplieron 8 minutos desde el comienzo de la sesión [218].

M.3.3.4. FASE DE MEDICIÓN:

En esta prueba, la estrategia óptima para conseguir todo el alimento disponible consiste en visitar cada brazo del laberinto una sola vez en la sesión, por lo que la rata tenderá a realizar un mapa mental del laberinto de aquellos brazos ya visitados y así optimizar la búsqueda de comida. En esta tarea las ratas utilizan la memoria de trabajo, que les permite recordar qué brazo han visitado para no inspeccionarlo de

nuevo. Es posible obtener una medida indirecta de la memoria de trabajo a través de la fórmula:

$$\text{nº de entradas a brazos previamente visitados} = \frac{\text{error de memoria de trabajo (EMT)}}{\text{EMT}}$$

Así, los datos obtenidos fueron el promedio de las últimas tres sesiones y se valoró:

- i) EMT
- ii) Tiempo para realizar la tarea
- iii) Tiempo de latencia (*i.e.* tiempo que tarda en elegir un brazo)

También se evaluó la progresión del aprendizaje de los animales utilizando los datos de 9 sesiones.

M.3.4. Estudio de la memoria de reconocimiento mediante la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR).

Para la optimización de animales y tiempo de trabajo, esta prueba fue realizada en el mismo diseño experimental correspondiente a la prueba del cambio de set atencional, descrita más adelante (M.3.7). Así, la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR) fue incluida antes de la privación de comida (ver M.3.2) del diseño experimental descrito en M.3.1.

El protocolo de NOR se basó en el método utilizado en estudios previos [228, 229], donde se describe que esta prueba se ha de realizar en un campo abierto (90×90×50 cm) situado en una habitación homogéneamente iluminada y con objetos de similar textura, color y tamaño, pero de forma diferente (Figura M.4).

Procedimiento

M.3.4.1. FASE DE AMBIENTACIÓN:

Un día previo a la realización del test NOR, las ratas fueron colocadas en la caja de experimentación sin ningún objeto con la finalidad que el animal se habitúe al nuevo recinto.

M.3.4.2. FASE DE MEDICIÓN:

En la realización del *NOR* existen dos fases consecutivas:

- (i) La primera fase transcurre durante 5 min, donde se permite al animal que explore dos objetos idénticos separados 30 cm entre sí y a 10 cm de las paredes de la caja de experimentación. Transcurrido este tiempo, el animal vuelve a su jaula y espera 5 min.
- (ii) En la segunda fase, el animal regresa a la caja de experimentación donde uno de los objetos ha sido cambiado por uno diferente, mientras que el otro objeto es una copia idéntica del presentado en la primera fase. Durante 3 min se mide el tiempo (t) durante el cual la rata explora ambos objetos (*i.e.* la cabeza del animal no debe estar más lejos que a 2 cm del objeto)[228].

La capacidad para discriminar un objeto nuevo de otro familiar se expresa como el índice de discriminación (ID), que responde a la fórmula:

$$ID = t_{\text{explorando objeto nuevo}} - (t_{\text{explorando objeto familiar}} / t_{\text{total de exploración}})$$

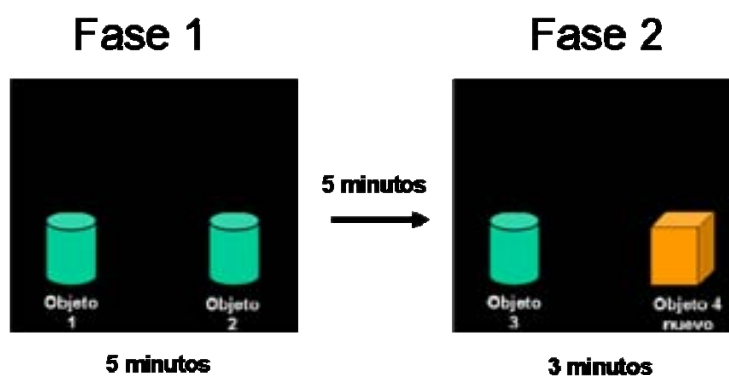


Figura.M.4: *Prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR)* : Se presentan las dos fases de NOR donde el objeto 3 es una copia idéntica del objeto 1 y el objeto 4 es un objeto nuevo

M.3.5. Evaluación de síntomas neuropsiquiátricos: grado de anhedonia

Para valorar la anhedonia en roedores, la prueba que se utiliza con mayor frecuencia es el test de preferencia de sucrosa [230]. Para su realización, y tras el test NOR, los animales fueron estabulados de forma individual y en cada extremo de su jaula se

colocaron dos botellas de agua previamente pesadas. Estas botellas se mantuvieron durante 24 hrs con la finalidad de lograr la adaptación de los animales a beber de dos botellas (fase de entrenamiento).

Finalizada esta etapa, una de las botellas fue reemplazada por solución de sucrosa 0.8% y tras 24 hrs, las botellas fueron cambiadas de posición para evitar efectos de neofobia, perseveración e inclinación hacia una dirección en particular [73]. El consumo de agua y de sucrosa se calculó pesando las botellas tras 2 días de prueba.

El consumo de sucrosa (expresado en porcentaje) se calculó según la ecuación:

$$\% \text{ preferencia de sucrosa} = \frac{\text{consumo de sucrosa}}{\text{consumo de sucrosa} + \text{consumo de agua}} \times 100$$

M.3.6. Estudio de la habilidad olfatoria mediante la prueba del alimento escondido

Esta prueba se utilizó con la finalidad de valorar la habilidad de los roedores para oler sustancias volátiles. En la misma se evaluó la rapidez del animal, en período de dieta, para encontrar un alimento oculto.

Se asume que si el animal no es capaz de localizar la comida en 15 minutos, presenta deficiencias en su habilidad olfatoria (hiposmia o anosmia) [231]. Dichas deficiencias pueden estar relacionadas con la integridad del sistema dopaminérgico [84].

En esta prueba, se realiza una modificación en la privación de comida (ver M.3.2). Así, 18 ó 24 hrs antes de la prueba de comportamiento, se retira toda la comida de la jaula. Esto otorga mayor sensibilidad a esta prueba respecto a una dieta moderada [232].

Procedimiento

M.3.6.1. FASE DE FAMILIARIZACIÓN:

Dos días previos a la evaluación, se colocó en la jaula del animal el mismo gránulo alimentario que se utilizará en la prueba. Si éste no es ingerido, se deduce que dicho alimento no es apetecible para el sujeto y por tanto se elegirá otro.

M.3.6.2. FASE DE MEDICIÓN:

En concreto se mide el tiempo que necesita el animal para encontrar la comida (*i.e.* tiempo de latencia). Así, el test comienza colocando al animal en la caja de experimentación (46 cm × 23 cm × 20 cm) con aserrín, donde en una de las esquinas se encuentra oculta la comida a 1 cm de profundidad.

Se procede al registro del tiempo y si tarda más de 15 minutos en encontrar el alimento, se aborta el experimento y se apunta 900 segundos como su tiempo de latencia [232, 233].

M.3.7. Estudio de la alteración de la flexibilidad cognitiva mediante la prueba de cambio de set atencional

En ambos grupos estudiados (6-OHDA y SHAM), el período de dieta comenzó al finalizar la prueba de preferencia de la sucrosa.

El protocolo utilizado en la prueba de cambio de set atencional, se basó en el método utilizado por McAlonan y cols. [195].

La prueba consiste en entrenar al animal para buscar la comida oculta entre dos posibles recipientes. La discriminación del animal ocurre a través de dimensiones perceptuales, que en este caso fueron la textura del material que recubre los recipientes y el medio de escarbado donde se encuentra la recompensa (*i. e.* 45 mg de gránulos de sucrosa, Bioserve).

El objetivo de la tarea es que los animales aprendan cual de las dimensiones presentadas (*i.e.* textura o medio de escarbado) actúa como estímulo positivo, es decir

aquella que presentaba la recompensa. Se considera el aprendizaje de una regla cuando el animal realiza seis elecciones consecutivas correctas.

Así, en una serie de discriminaciones perceptuales compuestas, el animal debe en primer lugar aprender una regla y formar un “set atencional” dentro de la misma dimensión perceptual (cambio intradimensional, *IDS*). Posteriormente el animal debe cambiar su atención hacia una dimensión que previamente actuó como estímulo irrelevante (cambio extradimensional, *EDS*) [186].

M.3.7.1. APARATO:

El aparato utilizado fue una caja de experimentación con divisiones que separan un compartimiento llamado “*start chamber*” (47 × 30 cm) de dos más pequeños (15 × 15cm cada uno). En estos últimos se colocaron dos recipientes de cerámica (diámetro interno: 7cm; profundidad: 5cm) fijados a una base y ésta a la caja. Tanto la base como el recipiente están recubiertos de un material con una textura particular. Además, en cada recipiente se deposita una recompensa y sobre ella se coloca un “medio de escarbado” (Figura M.5).

Procedimiento

La prueba se realizó durante tres días consecutivos y los parámetros que se valoraron fueron: (i) número de elecciones necesarias para alcanzar el criterio de seis elecciones consecutivas correctas; y (ii) número de elecciones por minuto.

M.3.7.2. HABITUACIÓN (DÍA 1):

Los animales aprendieron a buscar la comida en los recipientes con un determinado medio de escarbado durante 30 minutos. La comida se repuso cada 5 minutos.

M.3.7.3. ENTRENAMIENTO (DÍA 2):

Las ratas se entrenaron en una serie de discriminaciones simples donde los recipientes difieren sólo en una dimensión. Las primeras cuatro elecciones fueron codificadas como “elecciones de descubrimiento”. Una vez encontraron la comida, todo intento de encontrar la comida en el otro recipiente se contabilizó como error y no

se le permitió el acceso al recipiente con comida. El entrenamiento duró hasta que el animal alcanzó el criterio de seis elecciones consecutivas correctas. Todos los animales fueron entrenados usando el mismo estímulo y en el mismo orden. Por último, los estímulos utilizados en este día no volvieron a utilizarse en la siguiente fase del protocolo.

M.3.7.4. MEDICIÓN (Día 3):

Los animales fueron evaluados en una serie de discriminaciones perceptuales (Tabla M.1) y se les permitió avanzar a la etapa siguiente de la tarea una vez alcanzado el criterio de seis elecciones consecutivas correctas. Las discriminaciones se presentaron en orden de dificultad creciente para todos los animales: (i) DS , etapa donde se cambia sólo una característica; (ii) discriminación compuesta (DC), etapa donde se introduce una segunda característica irrelevante; (iii) ID , etapa en la cual se cambia el estímulo dentro de la misma dimensión; (iv) aprendizaje de inversión (Rev); donde la regla cambia, es decir, el estímulo que previamente es irrelevante pasa a ser relevante; y (v) ED, etapa donde el estímulo se encuentra en la dimensión que previamente era irrelevante (Figura M.5).

Las dimensiones utilizadas fueron alternadas entre cada rata estudiada, de modo que tanto el grupo 6-OHDA, como el SHAM fueron expuestos a cada cambio perceptual (*i.e.* del medio de excarbado a la textura, y de la textura al medio de excarbado). Además, tanto en el día del entrenamiento como el día de la prueba, se alternó la ubicación del recipiente con la comida para evitar la interferencia de una posible lateralización ipsilateral del animal lesionado.

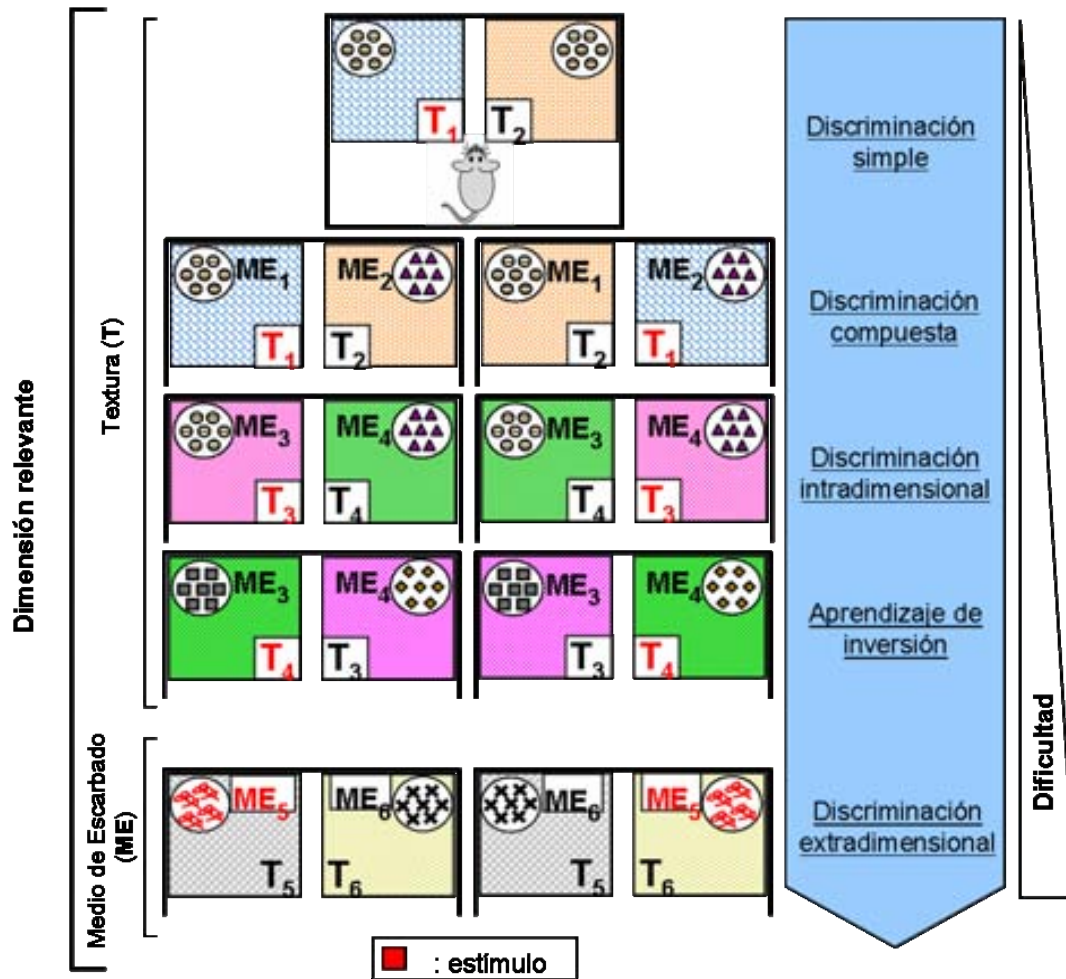


Figura M.5 : Prueba de cambio de set atencional. Se muestra la caja de experimentación con los dos compartimentos con texturas diferentes (T), y el círculo en cada uno de ellos contiene el medio de escarbado (ME). Conforme avanza la prueba la dificultad aumenta. Se marca en rojo donde se encuentra la recompensa.

Tabla M.1 : Texturas y medios de escarbados utilizados en el cambio de set atencional.

ETAPAS	DIMENSIONES		COMBINACIONES	
	RELEVANTE	IRRELEVANTE	(+)	(-)
DS	Textura	Medio Escarbado	Aluminio/ aserrín	Terciopelo / aserrín
CS	Textura	Medio Escarbado	Aluminio/ piedrillas	Terciopelo/ algodón
			Aluminio/algodón	Terciopelo/ piedrillas
ID	Textura	Medio Escarbado	Papel burbuja/ bolas poliespan	Revés terciopelo/ hojas secas
			Papel burbuja/ hojas secas	Revés terciopelo/ bolas poliespan
REV	Textura	Medio Escarbado	Revés terciopelo/ hojas secas	Papel burbuja/ bolas poliespan
			Revés terciopelo/ bolas poliespan	Papel burbuja/ hojas secas
ED	Medio Escarbado	Textura	Piedras grandes / celofán	Tiras nylon/ césped artificial
			Piedras grandes / césped artificial	Tiras nylon / celofán

Nota : DS, discriminación simple; CS, discriminación compuesta; ID, discriminación intradimensional; ED, discriminación extradimensional, REV, aprendizaje de inversión. (+) combinación donde se encuentra la recompensa; (-) combinación carente de recompensa.

M.4. Verificación de la lesión dopaminérgica mediante inmunohistoquímica

Al finalizar la correspondiente prueba de comportamiento, los animales empleados fueron anestesiados según lo descrito en M.2, y cuando no mostraron reflejos ante la estimulación dolorosa, se procedió a la perfusión intracardíaca de los mismos. En un primer momento, se hizo pasar suero salino heparinizado y a continuación se sustituyó por solución fijadora (fomaldehído al 10%; Panreac Química SA, Barcelona, España). Una vez finalizada la fijación, se procedió a la decapitación del animal y a la extracción del cerebro. El cerebro permaneció durante 24 hrs en la misma solución fijadora empleada durante la perfusión, y transcurrido el tiempo de fijación, los cerebros se sumergieron en una solución de sacarosa (Panreac Química, S.A., Madrid, España) al

30% en PBS 0,1 M, pH 7.4, para proteger el tejido durante la congelación. El tejido permaneció almacenado a una temperatura de -80 °C hasta su seriación.

La obtención de secciones histológicas -cortes coronales de 16 µm- correspondientes a la corteza prefrontal (CPF), cuerpo estriado, *Sustancia nigra pars compacta* (SNpc) y área tegmental ventral (VTA) fueron realizadas con microtomo de congelación Leitz.

Los cortes fueron fijados con acetona a 4 °C durante 10 min, luego lavados con PBS (*i.e.* tampón fosfato, pH= 7.4), para finalmente sumergirlos en H₂O₂ al 0,3% durante 10 min. Tras lavar nuevamente con PBS, los cortes se incubaron durante 20 min con un bloqueante proteico (Abcam, Cambridge, UK).

Así, los cortes bloqueados fueron incubados con un anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa (anti-TH), en una dilución 1:1000 (Anticuerpo primario; Abcam, Cambridge, UK) para las secciones de SNpc y VTA y con anticuerpo monoclonal anti-transportador de dopamina (anti-DAT), en una dilución 1:100 (Anticuerpo primario; Abcam, Cambridge, UK) para las secciones correspondientes a la corteza prefrontal y estriado. La incubación de los cortes con el correspondiente anticuerpo primario se realizó a 4°, toda la noche.

Tras dicha incubación, los cortes se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado en una dilución 1:1000 (Anticuerpo secundario; Abcam, Cambridge, UK) durante 30 min. A continuación se procedió a la incubación con el complejo avidina-biotina durante 30 min y protegido de la luz.

Finalmente se reveló con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) durante 10 min y se lavó con PBS para luego deshidratar con alcoholes de graduación creciente, embeber en xileno y cubrir con medio de montaje DPX-EXLI.

M.5. Análisis estadístico

En el estudio de la memoria de trabajo (ver M.3.3), los datos de la progresión de aprendizaje en el laberinto a lo largo de 9 sesiones diarias se compararon mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, seguido del test de Bonferroni. Además, los datos de EMT, tiempo de realización de la tarea y tiempo de latencia se compararon usando el test no-paramétrico Kruskal-Wallis seguido del post test de Dunn para comparaciones múltiples.

Los resultados obtenidos en la prueba del alimento escondido (ver M.3.4) , en la prueba NOR (ver M.3.5; índice de discriminación) y en la prueba de preferencia a la sucrosa (ver M.3.6) se analizaron mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

Para el análisis de los datos de la prueba de cambio de set atencional (ver M.3.7), se utilizó el test de ANOVA de dos factores para analizar los efectos de tarea y grupo. Además, ambos grupos (6-OHDA y SHAM) fueron comparados en las tareas individuales usando el test de Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann Whitney. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.; USA). Se consideró significativo todo valor de $p < 0.05$. Finalmente, todos los datos se expresan como la media \pm S.E.M.

M.6. Evaluación del comportamiento cognitivo en modelo de lesión dopaminérgica unilateral en respuesta al tratamiento crónico con L-DOPA

Para evaluar el efecto del tratamiento crónico con L-DOPA tanto en el comportamiento motor como cognitivo del modelo unilateral inducido por 6-OHDA, se desarrolló el siguiente diseño experimental.

M.6.1. Diseño experimental

De manera similar a lo descrito en M.3.1, el diseño experimental consta de una etapa basal y una etapa post-lesión, que además incluye una parte post-tratamiento con L-DOPA (Figura M.6). A dos nuevos grupos de animales se les sometió a privación de comida (ver M.3.2) al inicio de cada parte del diseño experimental (*i.e.* basal, post-lesión y post-tratamiento) y se les evaluó en paralelo la memoria de trabajo (ver M.3.3) ó la flexibilidad cognitiva mediante el test de cambio de set atencional (ver M.3.7). Posterior a los ensayos conductuales post-lesión, ambos grupos de animales fueron tratados durante 22 días con L-DOPA y en el transcurso del tratamiento crónico se les evaluó las discinesias. Finalizado el tratamiento, a ambos grupos de animales se les sometió nuevamente a las pruebas del laberinto radial de 8 brazos (ver M.3.3) ó al cambio de set atencional (ver M.3.7).

Así, el esquema del diseño experimental fue el siguiente:

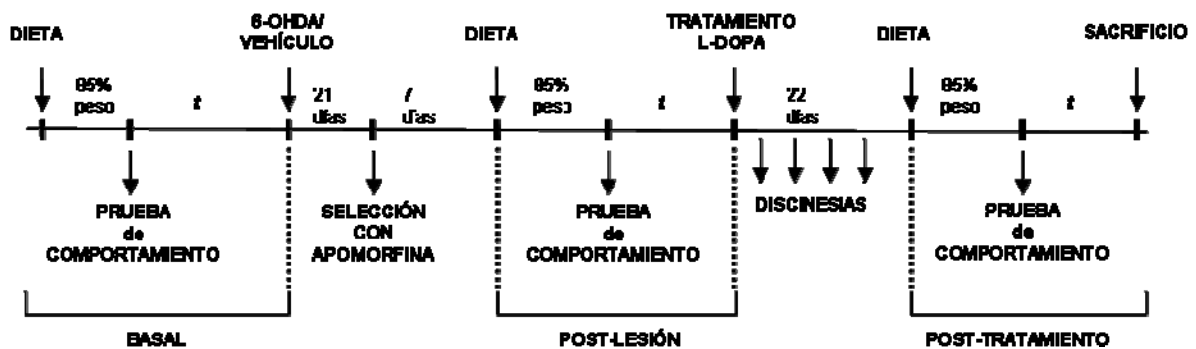


Figura M.6: Diseño experimental en modelo unilateral inducido por 6-OHDA y tratamiento crónico con L-DOPA. Se muestra esquemáticamente las etapas basal y post-lesión y post-tratamiento de los ensayos de comportamiento en ratas con inyección en MFB de 6-OHDA o vehículo. Los tiempos "t" variarán en función de la prueba de comportamiento realizada.

M.6.2. Protocolo de tratamiento crónico con L-DOPA

Una semana posterior a la última sesión de la prueba de comportamiento post-lesión correspondiente, los animales lesionados fueron separados de forma aleatoria en tres grupos: (i) tratamiento con L-DOPA (3 mg/kg, i.p., Sigma; n = 9); (ii) tratamiento con L-DOPA (6 mg/kg, i.p., Sigma; n = 9) y (iii) tratamiento con L-DOPA (25 mg/kg, i.p., Sigma; n = 9). La misma distribución se realizó con los animales SHAM. El tratamiento para todos los grupos se prolongó durante 22 días consecutivos. Treinta minutos antes de cada dosis de L-DOPA, para evitar la oxidación periférica de la misma, se administró el inhibidor de la DOPA descarboxilasa, benserazida (15 mg/kg, i.p., Sigma), disuelta en suero salino.

M.6.3. Valoración de las discinesias inducidas por el tratamiento crónico de L-DOPA

Las discinesias inducidas por la administración de L-DOPA se valoraron según la escala de discinesias para ratas [218, 234]. Así, las discinesias fueron evaluadas en el transcurso del tratamiento con L-DOPA los días 1, 8, 15 y 22.

Los animales se colocaron individualmente en las cajas de experimentación y se observaron cada 20 min de un total de 240 min, comenzando 20 min antes de la inyección de L-DOPA. En cada observación realizada, las discinesias se monitorizaron durante 1 min.

Tres subtipos de discinesias fueron clasificadas de acuerdo a su distribución topográfica: (1) discinesias axiales, *i.e.* postura distónica o movimientos coreiformes del cuello hacia el lado contralateral de la lesión; (2) discinesias de las extremidades, *i.e.* movimientos repetitivos de la extremidad delantera contralateral a la lesión; y (3) discinesias orolinguales, *i.e.* protrusión de la lengua.

De acuerdo a la literatura [218, 234], las discinesias fueron puntuadas en una escala de 0 a 4, donde 0=ausente; 1=ocasional, *i.e.* presente durante menos del 50% del tiempo de observación; 2=frecuente, *i.e.* presente durante más del 50% del tiempo de

observación; 3=continuo, pero interrumpido ante un estímulo sensorial; 4=continuo y no interrumpido ante un estímulo sensorial.

M.6.4. Valoración de la memoria de trabajo post-tratamiento crónico con L-DOPA

Tras el tratamiento crónico con las diferentes dosis de L-DOPA descritas en M.6.2, a los animales en estudio se les evaluó la memoria de trabajo utilizando el laberinto radial de 8 brazos, tal y como se ha descrito previamente en M.3.3.

M.6.5. Estudio de la flexibilidad cognitiva post-tratamiento crónico con L-DOPA

Del análisis de las discinesias y la memoria de trabajo en respuesta a las diferentes dosis de L-DOPA, se seleccionó una dosis "intermedia" de L-DOPA para valorar la flexibilidad cognitiva mediante el test de cambio de set atencional (ver M.3.7) en animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA en el MFB y tratados crónicamente con L-DOPA.

M.6.6 Análisis estadístico

Las discinesias inducidas por el tratamiento de L-DOPA fueron analizadas utilizando una ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni.

Los resultados obtenidos de la respuesta a la L-DOPA en las pruebas de la memoria de trabajo y cambio de set atencional fueron comparados utilizando el test no-paramétrico Kruskal-Wallis seguido de la prueba de U de Mann-Whitney. Se consideró estadísticamente significativo todo valor $p < 0.05$. Todos los datos se expresan como la media \pm S.E.M.

M.7. Análisis molecular de la respuesta al tratamiento crónico con L-DOPA

Para estudiar los efectos a nivel molecular de la administración crónica de L-DOPA a la dosis intermedia de 6mg/Kg, analizamos en la corteza prefrontal (CPF) de los animales estudiados, la regulación génica de los receptores dopaminérgicos (DrDx) mediante el estudio de la expresión de sus transcritos. Para ello, se aisló y purificó el RNA total de la CPF, se obtuvieron los correspondientes DNA complementarios (cDNA), para finalmente determinar los niveles de RNA mensajero (mRNA) de los DrDx mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

M.7.1. Extracción de RNA total de la corteza prefrontal (CPF).

Tras el sacrificio de los animales y posterior extracción del cerebro, se aisló la CPF (+ 1.2 mm respecto a Bregma) y éste a su vez fue dividido en dos, ipsilateral y contralateral, según sea el lado donde se realizó la inyección de 6-OHDA o vehículo en el grupo de animales utilizados en M.6.5.

Así, el RNA total se aisló utilizando el reactivo *TriReagent* (Sigma), siguiendo el protocolo del fabricante basado en el método de guanidinio-tiocianato. El RNA extraído fue resuspendido en 30 µl de H₂O tratada con 0.1% de dietilpirocarbonato (DEPC, un inhibidor de RNAsas; Sigma). La cuantificación del RNA se realizó por espectrofotometría UV utilizando el aparato *NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop Technologies).

M.7.2. Transcripción reversa

A partir de 1 µg del RNA (diluído en H₂O-DEPC) extraído en el punto anterior, se obtuvo el cDNA mediante una transcripción inversa o reversa (retrotranscripción; RT). La reacción de RT se realizó en un termociclador *Applied Biosystems 2720*, donde primeramente se desnaturalizó el RNA (en 10 µl) durante 3 minutos a 70° C. El RNA

desnaturalizado se llevó a un volumen final de 25 μ l en una solución constituida por Tampón 1X (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂) (Invitrogen), 1 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), 5 mM ditioneitol (DTT, Sigma), 100 ng de hexámeros aleatorios (Roche Molecular Biochemicals), 40 U del inhibidor de RNasas (*RnaseOut*, Invitrogen) y 200 U de la enzima M-MLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Invitrogen). La solución final se incubó a 37° C durante 60 minutos. Posteriormente, la enzima se inactivó manteniendo la reacción 5 minutos a 95° C. Los cDNA obtenidos fueron finalmente diluidos hasta un volumen final de 200 μ l de H₂O milliQ. Por último, se utilizaron 4 μ l (20 ng de cDNA) de esta disolución como molde para la reacción de PCR en tiempo real (M.7.3).

M.7.3. PCR cuantitativa en tiempo real

Para cuantificar los niveles de mRNA de los receptores dopaminérgicos (DrDx) en la corteza prefrontal (CPF) (*i.e.* ipsi y contralateral) de ratas tratadas con L-DOPA 6 mg/Kg ó vehículo, se amplificó específicamente por PCR en tiempo real cada uno de los transcritos de DrDx mediante el sistema *7900HT fast real-time PCR detection system* (Applied Biosystems). Las reacciones de amplificación se hicieron en un volumen total de 10 μ l que contenía 20 ng de cDNA; 0,5 μ M de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido necesarios para amplificar específicamente los distintos transcritos de DrDx (Tabla M.2), así como el transcrito del gen de β -actina (bAct, Tabla M.2) usado como control interno, y el mRNA del gen β -tubulina clase III (Tubb-3; Tabla M.2) usado como marcador neuronal; y 5 μ l de la solución 2X *Fast SYBR Green Mastermix* (Applied Biosystems), que contiene el marcador *SYBR Green I*, dNTPs; enzima *AmpliTa Gold® Fast DNA* polimerasa, uracil-N-glicosilasa para prevenir reamplificación inespecífica; y el marcador ROX como control interno pasivo. Las condiciones de la PCR fueron las mismas para las distintas parejas de oligonucleótidos utilizados (Tabla M.2).

Tabla M.2. Oligonucleótidos utilizados en el estudio de la expresión de transcritos para los receptores de dopamina en CPF mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Mensajero	Oligo	Secuencia (5'→3')	Orientación
DrD1a	Drd1a-s	GCCTTTGACATCATGTGCTC	→
	Drd1a-a	TGGACTGCTGCCCTCTCC	←
DrD2	Drd2-s	TGAGATCCAGACCATGCCC	→
	Drd2-a	CTGTTGACATAGCCCAGCC	←
DrD3	Drd3-s	CTTTGGAGGTGACAGGTGGAG	→
	Drd3-a	CAGGGTTGGAGATGGAGCAG	←
DrD4	Drd4-s	GCGTGCTGCTCATCGGC	→
	Drd4-a	CGCACAGGTTGAAGATGGAGG	←
DrD5 (ó DrD1b)	Drd5-s	CCTTGTCCATCCTCATCTCC	→
	Drd5-a	CCTTGGTCTCCTTCTTGATGG	←
β-Actina	bAct-s	TCCTGACCCTGAAGTACC	→
	bAct-a	ACAATGCCAGTGGTACGACC	←
β-tubulina clase III	Tubb3-s	CTCACAAAGTATGTGCCCAG	→
	Tubb3-a	TGATGAGCAGTGTGCCCATG	←

Oligo: Oligonucleótidos; símbolos: →, sentido; ←, antisentido.

Primero se realiza una desnaturalización de 20 seg. –necesaria además para que la *AmpliTa Gold® Fast* DNA polimerasa se active –, y luego una repetición de 40 ciclos que constan de 1 seg de desnaturalización a 95° C y 20 seg a 60° C que comprenden tanto la unión de los oligonucleótidos al molde o *melting*, como la extensión de la polimerasa. En cada ciclo, el termociclador *7900HT fast* detecta la fluorescencia del marcador, *SYBR Green I*, en la mitad de la fase de extensión. Una vez finalizados los ciclos de amplificación, y para comprobar que sólo se ha amplificado un fragmento, se obtiene una curva de fusión o *melting* con el mismo aparato, que consiste en monitorizar la fluorescencia del aumento paulatino de la temperatura hasta llegar a la desnaturalización del producto de PCR, con la consecuente caída brusca de

intensidad fluorescente (el *SYBR Green I* emite fluorescencia sólo cuando está unido a doble hebra de DNA). En cada caso, la obtención de la curva *melting* mostró (en unidades de δ fluorescencia/ δt versus temperatura) un único pico, sugiriendo que el fragmento amplificado era único, y con ello la no existencia de inespecificidades en la qPCR.

La estimación relativa de los niveles de mRNA de DrD1a, DrD2, DrD3, DrD4 y DrD5 fueron calculados a partir de la curva de progresión de la qPCR (fluorescencia versus ciclo), en donde se determinó el ciclo umbral (*cycle threshold* o Ct) a partir del cual la señal de fluorescencia empieza a incrementar exponencialmente.

Estimando que la eficiencia real de amplificación de la PCR oscila alrededor del 80%, se trabajó bajo el supuesto que la curva de incremento de fluorescencia tras cada ciclo de la PCR obedecía a una curva exponencial de tipo:

$$N \times (1+0,8)^n,$$

donde N es el número de copias iniciales y n es el número de ciclos. Y puesto que utilizamos β -Actina como control normalizador interno y el marcador neuronal β -tubulina clase III para diferenciar dentro de todos los mRNA de la CFP a neuronas de otro tipo celular (e.j. glía), todas las muestras fueron relativizadas a estos genes según la ecuación:

$$\text{Valores relativizados} = 1,8^{[(bAct - DrDx) - Tubb3]}$$

donde los super-escritos bAct; DrDx y Tubb3 corresponden a los Ct para β -Actina, para cada mensajero del correspondiente receptor de dopamina y para β -tubulina clase III, respectivamente.

M.7.4: Análisis estadístico

El patrón de expresión de los receptores dopaminérgicos en la CPF, se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de U de Mann-Whitney. Se consideró estadísticamente significativo todo valor $p < 0.05$. Todos los datos se expresan como la media \pm S.E.M.

M.8. Generación de un modelo de lesión dopaminérgica asimétrica bilateral

Para la obtención de un modelo de parkinsonismo en rata con lesión dopaminérgica bilateral se procedió de manera similar a lo explicado en M.2, con modificaciones que se detallarán a continuación.

La mayor modificación es que la inyección de la solución de 6-OHDA se realizó en el MFB en ambos hemisferios. Por tanto, las coordenadas estereotáxicas de cada inyección de 6-OHDA fueron las mismas que las detalladas en M.2., aunque simétricas, (*i.e.* AP: -4,4mm, Lat: -1/+1 mm respecto al bregma, profundidad 7,8 mm respecto a la duramadre), ya que el sitio de lesión (*i.e.* MFB) es el mismo que en el modelo unilateral (ver M.2).

Se realizaron dos modelos de lesión en función de la concentración de neurotoxina inyectada: (i) 6 μ g y 4 μ g de 6-OHDA en estriado izquierdo y derecho, respectivamente y denominado modelo "6/4"; y (ii) 4 μ g y 2 μ g de 6-OHDA en estriado izquierdo y derecho, respectivamente y denominado como modelo "4/2".

M.8.1. Evaluación de la actividad motora de los modelos con lesión dopaminérgica bilateral asimétrica

El estudio del patrón de actividad locomotora espontánea se realizó a través de la prueba de actimetría. El aparato de medición (Figura M.7) consiste en una plancha horizontal con dos marcos (45 x 45 cm) que contienen células infrarrojas (32 células por marco) distribuidas en todo su perímetro y que permiten medir la magnitud de la

actividad motora. Dicha actividad se mide por el análisis de la posición y de la frecuencia con la cual el animal de experimentación corta los rayos infrarrojos.

Los marcos fueron controlados por una unidad de control independiente LE8825 (Panlab, S.L, Barcelona).

Los parámetros valorados fueron: actividad horizontal (*i.e.* movimientos deambulatorios) y actividad vertical ó *rearings* (*i.e.* el animal levanta las patas delanteras en actitud exploratoria).

La unidad de medida de la actividad motora obedece al número de cortes del rayo infrarrojo (*counts*).



Figura M.7: Sistema Actimeter para medir actividad locomotora espontánea

M.8.2. Evaluación de síntomas neuropsiquiátricos : grado de anhedonia

Tras realizar el test NOR, a los animales en estudio se les evaluó el grado de anhedonia mediante la prueba de preferencia a la sucrosa, tal y como se ha descrito previamente en M.3.6.

M.8.3. Determinación de dopamina y serotonina y sus respectivos metabolitos en el estriado y en la corteza prefrontal .

Transcurridos 25 días de la lesión bilateral en MFB, los cerebros de los animales (N=20) fueron inmediatamente extraídos y se disecaron distintas regiones cerebrales (*i.e.* estriado y corteza prefrontal) que rápidamente fueron congeladas a -80 °C.

La separación de las distintas monoaminas y metabolitos se realizó mediante una cromatografía líquida de alta definición (HPLC) con columna de fase reversa y la

cuantificación mediante detector electroquímico. Así, se determinaron los niveles de dopamina (DA) y serotonina (5-HT) y sus respectivos metabolitos.

Los metabolitos de la DA determinados fueron el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), resultante de la oxidación de la dopamina por acción de la MAO; y el ácido homovanílico (HVA), producto final del metabolismo de la DA mediado por la MAO y por la catecol-O-metil-transferasa (COMT).

También se cuantificaron los niveles de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), metabolito de la serotonina.

El recambio de dopamina se calculó según la ecuación :

$$\text{Recambio de dopamina} = \frac{[\text{HVA} + \text{DOPAC}]}{[\text{DA}]}$$

Y el recambio de 5-HT se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Recambio de serotonina} = \frac{[\text{5-HIAA}]}{[\text{5-HT}]}$$

M.8.4: Análisis estadístico

Las diferencias en los niveles de DA y 5-HT en estriado y CPF, así como sus respectivos metabolitos entre los diferentes grupos (*i.e.* SHAM y doble lesión), se estudiaron mediante el test de Kruskal-Wallis seguido del post test de Dunn para comparaciones múltiples. Para el análisis de los datos de la actividad motora, y del test de preferencia de sucrosa, se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney.

La correlación entre el consumo de sucrosa (%) y el recambio de 5-HT estriatal (*i.e.* 5-HIAA/5-HT) de los grupos SHAM y 6/4 se analizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman (r_s).

RESULTADOS

R.1. Estudio neuroquímico de la lesión dopaminérgica unilateral mediada por 6-OHDA

A pesar que metodológicamente este estudio se realizó al final del correspondiente diseño experimental, para la mejor comprensión de los resultados de las pruebas de comportamiento realizada a los diferentes grupos de animales, se detallará en primera instancia lo observado en la inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH) y transportador de dopamina (DAT) que valora la alteración neuroquímica resultante de la inyección unilateral de 6-OHDA en MFB (ver M.4).

La inmunohistoquímica realizada en los cortes histológicos de cerebro descritos en M.4 puso de manifiesto la presencia de TH en las neuronas dopaminérgicas de los núcleos donde se origina la vías nigroestriatal (*i.e. Sustancia nigra pars compacta*; SNpc) y la vía mesolímbica (*i.e. área tegamental ventral*; VTA), así como la presencia de DAT en el estriado y en la corteza prefrontal (CPF).

En el análisis cualitativo que muestra la Figura R.1A se observa que los cerebros de los animales con lesión dopaminérgica unilateral presentaron una mínima o nula inmunoreactividad para TH en SNpc ipsilateral (*i.e. hemisferio lesionado*) en comparación al SNpc contralateral (*i.e. hemisferio no lesionado*). Además, en VTA ipsilateral se observó un ligero descenso en la inmunoreactividad para TH en comparación al VTA contralateral.

Por otra parte, en concordancia con lo observado en las áreas A9 (*i.e. SNpc*) y A10 (*i.e. VTA*) para TH, también se detectó mínima o nula inmunoreactividad para DAT en el estriado dorsal y una leve disminución de dicha inmunoreactividad en el estriado ventral (Figura R.1B). Estos datos sugieren que, a pesar de observarse algo de pérdida neuronal dopaminérgica en VTA, la neurotoxina 6-OHDA administrada en el MFB, lesiona la vía nigroestriatal y preserva la vía mesolímbica, de manera similar a lo descrito en pacientes en estadios tempranos de la enfermedad de laEP.

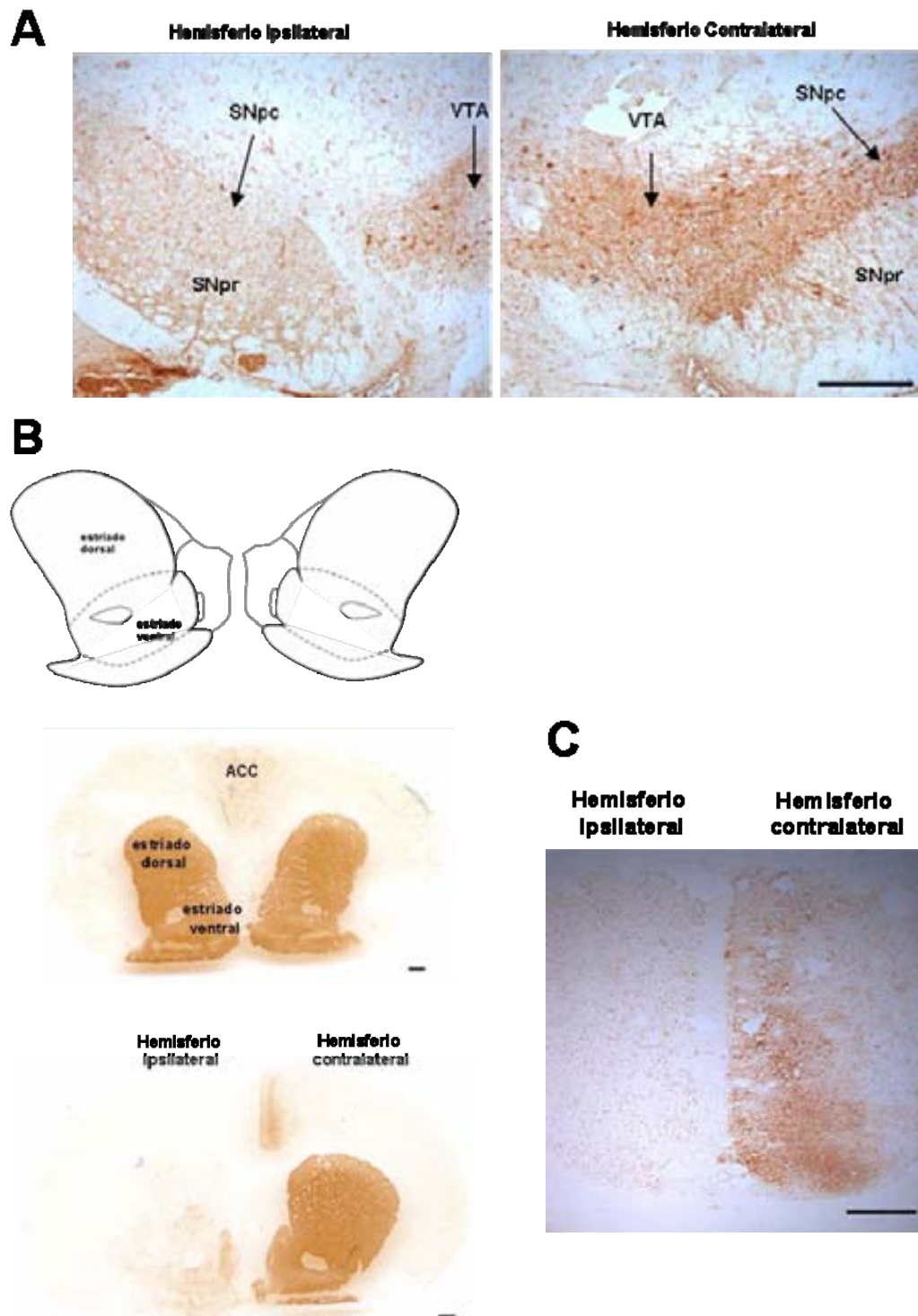


Figura R.1: Integridad dopaminérgica de las vías nigroestriada y mesolímbica tras la administración 6-OHDA en MFB izquierdo. Se muestra la inmunoreactividad para (A) TH en ambos hemisferios (*i.e.* ipsilateral y contralateral) de las células de SNpc y VT y la inmunoreactividad para DAT (B) en ambos hemisferios del estriado dorsal y ventral de un animal representativo del grupo SHAM (arriba) y del grupo 6-OHDA (abajo) y (C) en el cortex cingulado anterior (ACC). Las secciones coronales fueron obtenidas según las coordenadas -5.8 mm respecto a bregma para los núcleos dopaminérgicos; +1.2 mm respecto al bregma para estriado; + 1.2 mm respecto al bregma para la CPF [224]. en la esquina inferior derecha de cada figura la barra corresponde a 200µm.

Además, se observó ausencia de inmunoreactividad de DAT en la porción dorsal de CPF medial (corteza cingulada anterior) ipsilateral en comparación a la CPF contralateral (Figura R.1C)

R.2. Valoración de la memoria de trabajo en modelo unilateral de lesión dopaminérgica en rata

Con la finalidad de valorar si por los efectos de la lesión dopaminérgica en el modelo unilateral inducido por 6-OHDA en el MFB (ver M.2) se alteran las funciones cognitivas relacionadas con los estadios tempranos de la EP, estudiamos en primera instancia la memoria de trabajo.

Una vez realizado el test de apomorfina, a los animales correctamente denervados se les evaluó el comportamiento en el paradigma del laberinto radial de ocho brazos (ver M.3.3).

Aunque no se alcanzó la significación estadística ($p= 0.81$, Figura R.2A), las ratas lesionadas muestran un mayor número de entradas repetidas (EMT) en los brazos previamente visitados – parámetro que da idea de la memoria de trabajo (ver M.3.3.4) – en comparación con el grupo SHAM y basal.

En la Figura R.2B se puede observar que las curvas de aprendizaje al realizar la tarea son similares para los animales lesionados y el grupo SHAM ($p=0.75$), sugiriendo que la lesión dopaminérgica unilateral de la vía nigroestriatal no es suficiente como para alterar la habilidad del animal para usar la información espacial. Sin embargo, las ratas lesionadas necesitan más sesiones para alcanzar el criterio de aprendizaje comparado con el grupo SHAM, tal y como lo refleja el significativo número de errores cometidos el día 4 en comparación con el grupo SHAM ($p < 0.01$, Figura R.2B).

Respecto al tiempo invertido para completar la tarea, no se observan diferencias significativas entre los grupos ($p= 0.69$; Figura R.2C), sugiriendo la inexistencia de alteraciones motoras que podrían presentar los animales lesionados.

El tiempo de latencia evalúa indirectamente el grado de impulsividad de los animales además de la actividad motora. De manera similar al “tiempo para realizar la tarea”, no se observaron diferencias cuando se analizó el tiempo de latencia ($p = 0.16$; Figura R.2D), sugiriendo que la lesión con 6-OHDA en MFB tampoco altera la impulsividad de los animales.

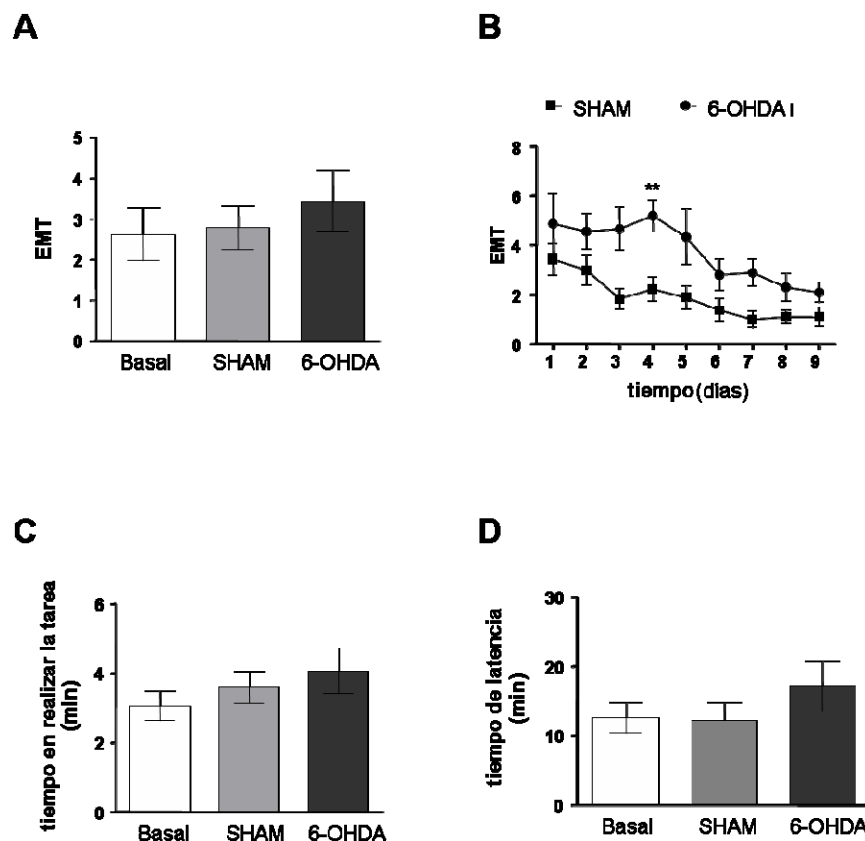


Figura R.2: Efectos de la lesión dopaminérgica unilateral en el comportamiento de los animales en el laberinto radial. (A) Error en la memoria de trabajo expresada como el número de entradas repetidas (EMT) en un mismo brazo del laberinto en las tres últimas sesiones. (B) Curva de aprendizaje de los animales de estudio expresada como el EMT en todos los días de la tarea. Se presenta también la evaluación de la actividad motora a través del (C) tiempo necesario para realizar la tarea y el (D) tiempo de latencia, que además evalúa el grado de impulsividad. Los valores se representan como la media \pm SEM; $n=8$. $**p<0.01$ versus SHAM, según el test ANOVA de dos factores seguido del test de Bonferroni.

R.3. Evaluación de la memoria de reconocimiento

Tal como se explica en Métodos (ver M.3.4) esta prueba fue realizada en el mismo diseño experimental correspondiente a la prueba del cambio de set atencional.

En la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (tarea que es regulada principalmente tanto por mecanismos colinérgicos como glutamatérgicos), se observó que las ratas lesionadas poseen la misma capacidad que el grupo control para discriminar un objeto nuevo de otro que le es familiar, dado que no se observaron diferencias significativas del índice de discriminación (ID) entre los grupos (Figura R3). Estos datos sugieren la preservación de mecanismos no dopaminérgicos en el modelo donde unilateralmente se lesiona el MFB con 6-OHDA.

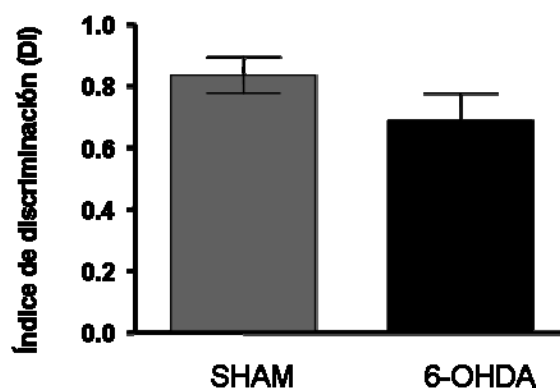


Figura R.3: Efecto de la lesión dopaminérgica en la memoria de reconocimiento. Se muestra el índice de discriminación (ID) para los objetos familiares *versus* los nuevos. Se presenta la media \pm SEM; N=11. (test de Mann-Whitney).

R.4. Estudio de la función olfatoria y motivacional en rata con lesión dopaminérgica unilateral

Las pruebas de comportamiento descritas más adelante requieren que el animal tenga intacto tanto su grado motivacional, como sus funciones sensoriales. Es por ello que se valoró tanto la habilidad olfatoria de los animales mediante el test del alimento escondido (ver M.3.6), como el grado motivacional mediante el test de la anhedonia (ver M.3.5).

Al realizar la prueba de preferencia a la sucrosa se comprobó que ambos grupos de animales (6-OHDA y SHAM) consumieron mayor cantidad de solución de sucrosa respecto al de agua, tal como lo indica el índice de preferencia a la sucrosa ($p = 0,13$;

Figura R.4.A). Estos resultados nos indican que la lesión dopaminérgica unilateral no influyó en el grado de motivación de los animales.

Cuando se realizó la prueba del alimento escondido se observó que las ratas lesionadas presentaban un cierto grado de alteración de la habilidad olfatoria (*i.e.* hiposmia), aunque no fue significativa respecto al grupo SHAM ($p=0.18$; Figura R.4.B). Dicha alteración se vió reflejada en el mayor tiempo de latencia que presentaron las ratas lesionadas para encontrar el alimento. Estos resultados sugieren que la lesión unilateral dopaminérgica por sí sola no es suficiente para alterar significativamente la habilidad olfatoria del animal y que probablemente se requiera del compromiso de otros sistemas neuronales para que ello ocurra.

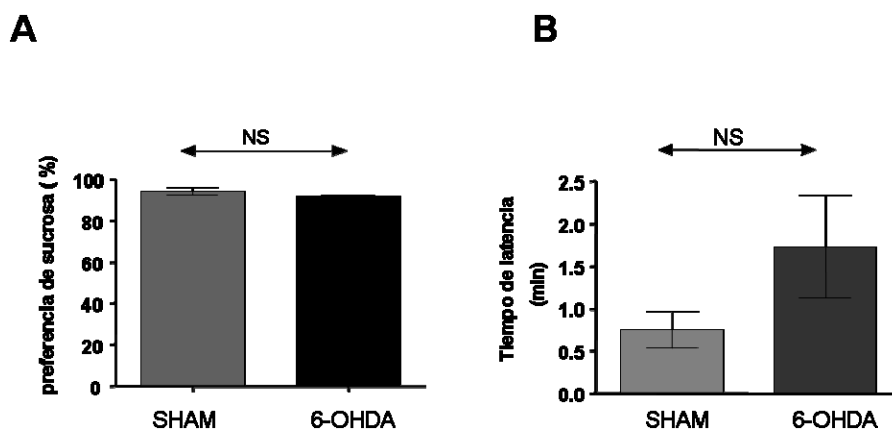


Figura R.4: Efectos de la administración 6-OHDA en la habilidad olfatoria y motivacional. Se presenta (A) la preferencia por la sucrosa expresado en % para ambos grupos y (B) el tiempo invertido para encontrar el alimento oculto (tiempo de latencia). Se muestra la media \pm SEM; N=11; NS, no significativo según test de Mann-Whitney.

R.5. Evaluación de la flexibilidad cognitiva en el modelo de rata hemiparkinsoniana

La valoración de la flexibilidad cognitiva se realizó mediante la prueba de cambio de set atencional (ver M.3.7). En el transcurso de esta prueba de comportamiento, la tarea valorada va incrementando su dificultad, primero dentro de una misma dimensión perceptual donde se valoraron la discriminación simple (SD), la discriminación compuesta (CD), y la discriminación intradimensional (ID). Luego se cambia la

dimensión perceptual para valorar la discriminación extradimensional (ED). Además, a esta misma prueba se le añadió una nueva categoría para evaluar una tarea dependiente de la corteza orbito-frontal valorada como el aprendizaje de inversión (REV), donde el estímulo que antes era irrelevante ahora es el que tiene la recompensa [195].

Así, se observó que los animales con lesión dopaminérgica presentaron dificultades significativas tanto en las fases de ID, como de ED en comparación al grupo SHAM (Figura R.5D). Dichas dificultades fueron cuantificadas como el número de intentos necesarios para completar la tarea: ID = 7.92 ± 1.65 (SHAM) vs. 14.78 ± 6.20 (6-OHDA), $p = 0.001$; y ED = 6.85 ± 1.14 (SHAM) vs. 12.00 ± 3.87 (6-OHDA), $p = 0.004$; (Figura R.5D).

Como se mencionó anteriormente, la tarea valorada incrementa su dificultad (aumento del número de intentos) a lo largo de la prueba, tal y como fue corroborado mediante la significación para el factor tarea ($p < 0.001$) según el test ANOVA de dos factores en todos los grupos estudiados. De manera similar, el factor grupo y la combinación de este con el factor tarea, influyen de manera muy significativa ($p < 0.001$; según ANOVA de dos factores) en la dificultad observada a lo largo del cambio de set atencional.

Para determinar la variación en el comportamiento de cada grupo estudiado conforme aumenta la dificultad de la tarea a realizar, se compararon el número de intentos realizados entre todas las fases de la prueba (*i.e.* SD, CD, ID, REV y ED) y dentro del mismo grupo de estudio. Así, a diferencia de lo observado antes de la intervención quirúrgica (Basal, Figura R.5A) donde no existen diferencias entre las categorías, las ratas del grupo SHAM presentaron dificultades significativas para discriminar el estímulo relevante en la misma dimensión perceptual (SD vs. ID y CD vs. ID; $t = 2.99$, $p = 0.011$ y $t = 3.14$, $p = 0.008$, respectivamente; Figura R.5B), aunque esta dificultad no fue significativa cuando su atención fue dirigida a una dimensión diferente (ED). Se observó algo similar en las ratas con lesión dopaminérgica unilateral (6-OHDA, Figuras

R.5C y R.5D), aunque si presentaron mayor número de elecciones necesarias para completar la categorías ID y ED, en comparación con las categorías SD y CD (Figura R.5C; SD vs. IDS $t = 4.06$, $p = 0.004$; SD vs. EDS $t = 4.31$, $p = 0.003$; CD vs. IDS $t = 3.80$, $p = 0.005$; y CD vs. EDS $t = 3.87$, $p = 0.005$). La influencia de la lesión dopaminérgica en el rendimiento de los animales en el mantenimiento de la atención ID y ED se vió reflejada al comparar los grupos SHAM y 6-OHDA, donde se observaron diferencias muy significativas para ambas categorías (Figura R.5D).

A pesar de la dificultad del grupo 6-OHDA para mantener la atención en una misma dimensión relevante, curiosamente no se observaron diferencias significativas entre las categorías ID y ED dentro del mismo grupo (Figura R.5C).

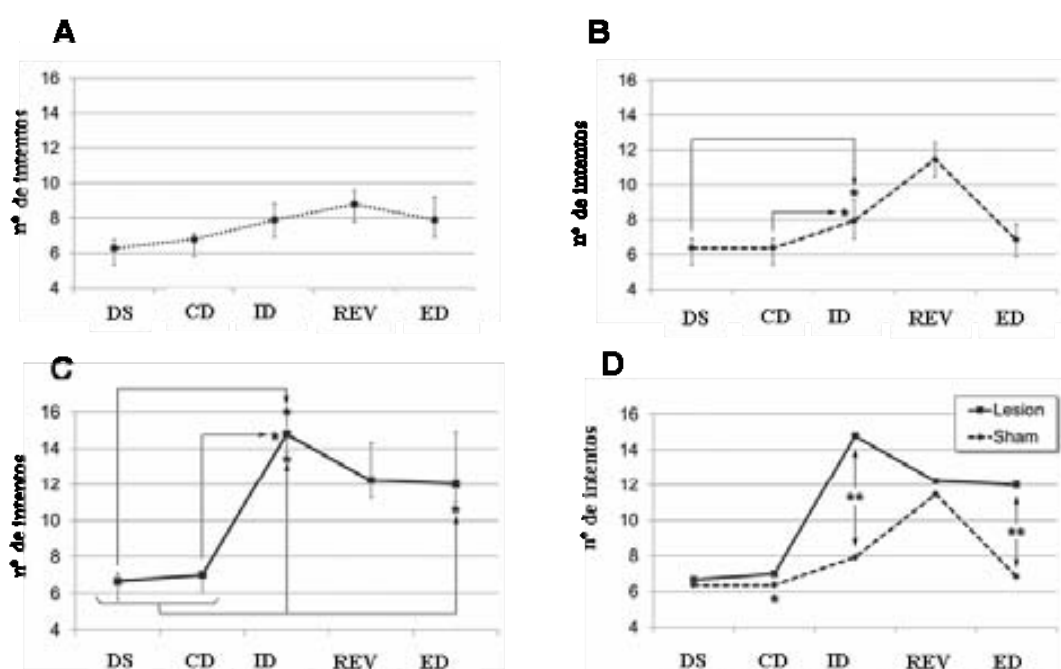


Figura R.5: Efectos de la lesión con 6-OHDA en la ejecución de la prueba de cambio de set atencional. Las etapas evaluadas en esta prueba fueron discriminación simple (SD); discriminación compuesta (CD); discriminación intradimensional (ID); aprendizaje de inversión (REV); y discriminación extradimensional (ED). La figura muestra la ejecución de las distintas tareas de la prueba (A) antes de la lesión, (B) del grupo SHAM (N=13) y (C) del grupo lesionado, 6-OHDA (N= 9). Además en (D) se comparan los grupos 6-OHDA y SHAM. Se muestra la media \pm SEM En D, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, según el test ANOVA de dos factores seguido del test de Bonferroni. En B y C * $p < 0.05$, según Kruskal Wallis seguido de la prueba de Mann-Whitney.

Por otra parte, cuando se analizó la tarea de inversión de aprendizaje, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon los grupos 6-OHDA vs

SHAM (11.50 ± 0.64 vs. 12.17 ± 1.27 ; $p = 0.70$), sugiriendo que la lesión no influye en la ejecución de dicha tarea (Figura R.5D).

R.6. Evaluación de la actividad locomotora de las ratas lesionadas con 6-OHDA

Para descartar cualquier alteración motora en los animales lesionados con 6-OHDA que pudiera interferir en la interpretación de los resultados, se valoró la actividad motora mediante la determinación de “elecciones por minuto” realizada por los animales en cada etapa de la prueba del cambio de set atencional.

No se observaron diferencias significativas en el número de elecciones por minuto entre ambos grupos (SHAM y 6-OHDA) en ninguna de las etapas de la prueba de cambio de set atencional (Tabla R.1).

Tabla R.1: *Efecto de la lesión con 6-OHDA en la actividad locomotora*

ETAPAS	SHAM	6-OHDA	<i>p</i>
DS	1.23 ± 0.17	1.14 ± 0.17	0.18
DC	1.38 ± 0.26	1.12 ± 0.11	0.10
ID	1.54 ± 0.34	1.87 ± 0.82	0.31
REV	1.69 ± 0.46	1.61 ± 0.43	0.26
ED	1.47 ± 0.32	1.35 ± 0.27	0.64

Nota: La actividad locomotora está medida como número de elecciones por minuto. Se muestra la media \pm S.E.M. *p* representa el análisis estadístico usando el t-test de Student

R.7. Valoración de las discinesias inducidas por L-DOPA en ratas hemiparkinsonianas

Con el objetivo de hallar una dosis adecuada de L-DOPA para valorar su efecto en el rendimiento cognitivo de los diferentes grupos de estudio, los animales se sometieron a terapia sustitutiva de dopamina durante 22 días y se valoraron las discinesias los días 1, 8, 15 y 22 del tratamiento.

El análisis estadístico utilizando el test ANOVA de dos factores mostró diferencias significativas en el factor dosis de tratamiento ($p < 0.0001$) y en la interacción de los factores dosis y día de tratamiento ($p = 0.03$); en tanto que no se observaron diferencias en el factor tiempo (días) para cada tratamiento en los días evaluados ($p = 0.17$; Figura R.6). Estos datos indican que la sobresaturación de las neuronas residuales a la lesión dopaminérgica, con la consecuente aparición de discinesias, depende fundamentalmente de la dosis de L-DOPA.

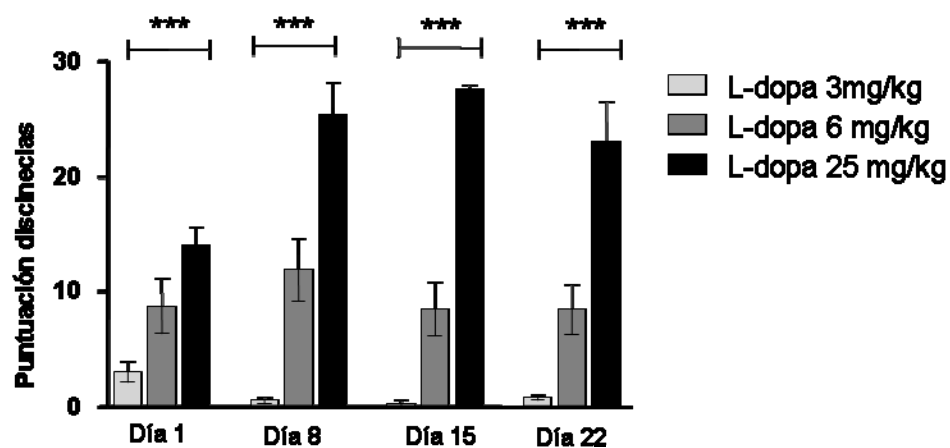


Figura R.6: *Discinesias inducidas por la administración crónica de L-DOPA a diferentes dosis.*

Se muestran las puntuaciones de la valoración de las discinesias inducidas en el tiempo (días) por diferentes concentraciones de L-DOPA. Se muestra la media \pm SEM, $N = 9$. $p < 0.001$, según ANOVA de dos factores. (***) Diferencias significativas respecto las diferentes dosis del tratamiento.

R.8. Memoria de trabajo de las ratas lesionadas con 6-OHDA y tratadas con L-DOPA

Si bien no se observaron diferencias significativas cuando se valoró la memoria de trabajo en el modelo animal de lesión dopaminérgica unilateral (ver R.2), el estudio de dicha tarea cognitiva se llevó a cabo con posterioridad al reemplazo dopaminérgico para valorar un “posible efecto tóxico” de la L-DOPA tras 22 días de tratamiento crónico a diferentes dosis.

En la Figura R.7 se observa que las ratas tratadas con la mayor dosis de L-DOPA (25 mg/kg) presentan un empeoramiento de la memoria de trabajo respecto a su situación previa al tratamiento y también respecto a grupo SHAM (2.5X). Por otra parte, la dosis seleccionada como intermedia de 6 mg/kg de L-DOPA mostró una mejora significativa en la memoria de trabajo respecto al grupo SHAM (1.5X) y a su situación previa al tratamiento.

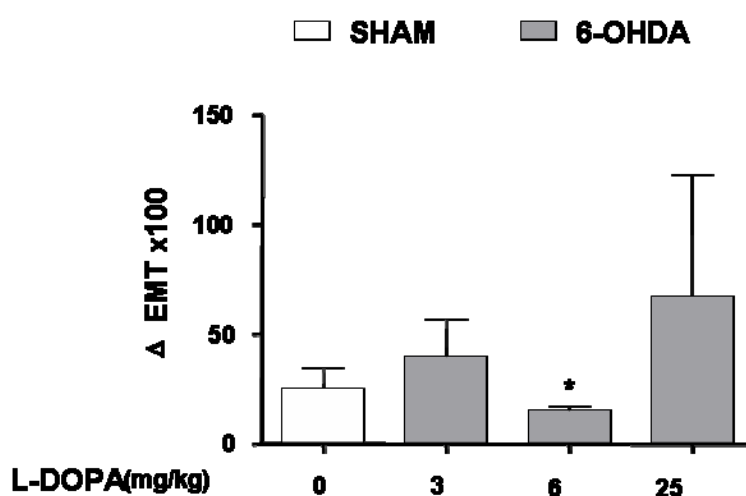


Figura R.7: Efecto del tratamiento crónico de L-dopa en la memoria de trabajo. Se presenta la diferencia en el error de la memoria de trabajo (EMT) entre el grupo 6-OHDA sin tratamiento con el grupo SHAM ó ratas lesionadas y tratadas durante 22 días con 3, 6 ó 25 mg/kg de L-DOPA. Se muestra la media \pm SEM, N= 9. (*) $p < 0.05$ según Kruskal-Wallis seguido de la prueba de U de Mann-Whitney

R.9. Efecto del tratamiento crónico con L-DOPA en la flexibilidad cognitiva de ratas hemiparkinsonianas

Basándonos en los resultados descritos en el punto anterior y en datos previamente publicados [235], se seleccionó la dosis de 6 mg/Kg para el tratamiento crónico (22 días) con L-DOPA a utilizar en la valoración de la flexibilidad cognitiva mediante la prueba de cambio de set atencional (ver M.3.7)

Como se observa en la Figura R.8, los animales lesionados y tratados crónicamente con L-DOPA mejoraron significativamente la ejecución de las categorías ID y ED en

comparación con el grupo SHAM ($p=0.02$, Figura R.8), contrariamente a lo observado con anterioridad cuando se evaluó sólo la lesión dopaminérgica unilateral (ver R.5). De manera similar a lo observado en R.5, no se observaron diferencias en la inversión de aprendizaje por el efecto del tratamiento entre ambos grupos (REV, Figura R.8). Estos resultados confirman que el empeoramiento de la discriminación aprendida antes de la lesión, se debe a la depleción unilateral dopaminérgica, ya que el restablecimiento dopaminérgico mediado por la administración crónica de L-DOPA es capaz de revertir dicho empeoramiento.

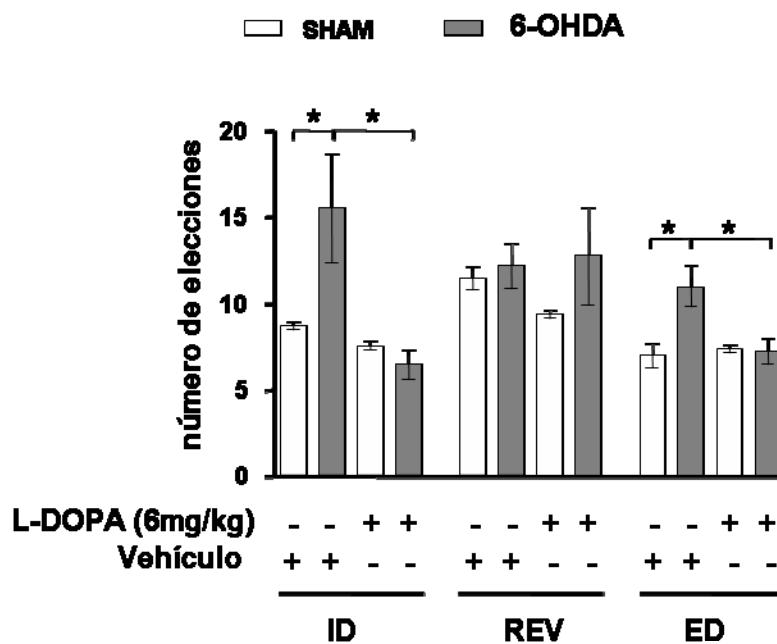


Figura R.8: Efecto del tratamiento crónico con L-DOPA en la prueba de cambio de set atencional. Representación del número de elecciones para superar cada tarea de discriminación en la prueba de cambio de set atencional ejecutadas por el grupo de ratas con lesión dopaminérgica unilateral (6-OHDA; N= 6) y el grupo control (SHAM; N=5). Ambos grupos fueron tratados durante 22 días con L-DOPA (i.p 6mg/Kg) ó vehículo (i.p 0.02% ácido ascórbico). Se muestra la media \pm SEM * $p < 0.05$, según Kruskal-Wallis seguido de la prueba de U de Mann-Whitney

R.10. Patrón de expresión de los receptores dopaminérgicos en la CPF de ratas hemiparkinsonianas en respuesta al tratamiento crónico con L-DOPA

Para valorar las posibles cambios moleculares en la corteza prefrontal (CPF) tras la administración crónica de L-DOPA, se analizaron mediante RT-qPCR (ver M.7) los patrones de expresión de los diversos subtipos de receptores dopaminérgicos (DrDx), relativizando los niveles de mRNA de la CPF ipsilateral con los transcritos de la respectiva CPF contralateral y así anular el posible efecto compensatorio de la lesión dopaminérgica. Finalmente, los valores relativizados fueron comparados entre los distintos grupos de estudio.

Así, se observó que la lesión dopaminérgica en MFB provoca una disminución en la expresión de todos los DrDx en la CPF (ver 6-OHDA + vehículo, Figura R.9 [3ª columna]). Aunque no se observaron cambios significativos en el patrón de expresión de los transcritos para los subtipos de receptores dopaminérgicos DrD1, DrD2, DrD3 y DrD4 tras el tratamiento crónico con L-DOPA, se observó que la expresión del subtipo DrD5 sufre un incremento significativo en respuesta a dicho tratamiento ($p= 0.02$, respecto a los animales lesionados sin tratamiento; Figura R.9). Esta sobreexpresión fue capaz incluso de reestablecer los niveles de expresión observados en el grupo control (SHAM, Figura R.9).

Estos resultados sugieren que la acción molecular de L-DOPA en la CPF es capaz de modular diferencialmente un subtipo específico de receptor dopaminérgico, DrD5, y con ello disponer en la neurona postsináptica de una vía de señalización estimuladora asociada a adenosil monofosfato cíclico (AMPC) que presenta mayor actividad y afinidad por su agonista que el subtipo DrD1, perteneciente a la misma categoría estimuladora que DrD5 [236].

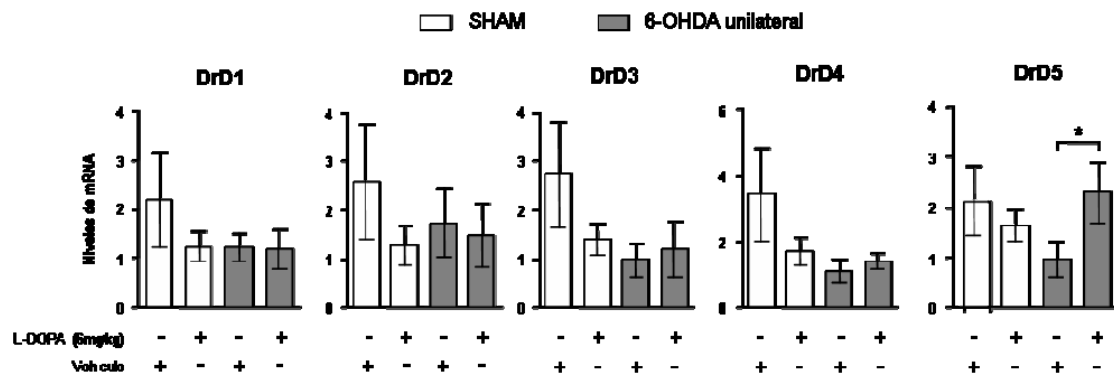


Figura R.9: Patrón de expresión de los receptores dopaminérgicos en la CPF. Se muestra los niveles de mRNA para los cinco subtipos de receptores dopaminérgicos (DrDx) en la CPF de ratas lesionadas con 6-OHDA ó SHAM tratadas con L-DOPA ó vehículo (*i.e.* 0.02% ácido ascórbico) durante 22 días. Los valores (normalizados con el mRNA de actina y relativizados con mRNA del marcador neuronal Tubb3) son expresados como la relación entre los niveles del transcrito correspondiente en el hemisferio ipsilateral con los del hemisferio contralateral. Se muestra la media \pm SEM, $n=7$; * $p < 0.05$ de acuerdo a Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Mann-Whitney.

Por otra parte, el análisis de Spearman evidenció que los niveles del transcrito del receptor dopaminérgico DrD5 correlaciona negativamente y de manera significativa con el rendimiento del ID (Tabla R.2), indicando que a mayor expresión de dicho receptor, menor es el número de elecciones necesarias para realizar la tarea.

Tabla R.2: Correlación entre la expresión de DrD5 en CPF y el rendimiento en la prueba de cambio de set

Rendimiento en versus		ID	REV	ED
Expresión de mRNA DrD5 en CPF	r_s p value	-0,4315 $p < 0.0001$	-0,1265 0,2120	-0,1265 0,0008

Nota: el rendimiento se expresa como número de intentos. ID, discriminación intradimensional; REV, aprendizaje de inversión; ED, discriminación extradimensional; r_s , coeficiente de correlación de Spearman.

R.11. Caracterización bioquímica del modelo de lesión dopaminérgica bilateral asimétrica

Para la obtención de un modelo animal de parkinsonismo más representativo de la neurodegeneración observada en la EP, se generó un modelo en rata con lesión dopaminérgica bilateral asimétrica (ver M.8). Esta asimetría fue obtenida mediante la inyección de diferentes cantidades de 6-OHDA en MFB derecho e izquierdo, donde el lado ipsilateral (I, Figura R.10) correspondió a aquel hemisferio que recibió la mayor cantidad de 6-OHDA, y el lado contralateral (C, Figura R.10) a aquel con menor dosis de 6-OHDA. Así, la inyección en el MFB ipsilateral y contralateral de 6 μ g y 4 μ g, o 4 μ g y 2 μ g de 6-OHDA, generaron los modelos 6/4 y 4/2, respectivamente (ver M.8).

En la caracterización de estos modelos bilaterales, se analizaron los niveles de dopamina (DA) y serotonina (5-HT) y sus respectivos metabolitos (ver M.8.3).

Aunque se observó que los modelos 6/4 y 4/2 presentaron en ambos hemisferios una disminución de los niveles de DA en comparación al grupo control (Figura R.10), dicha disminución fue significativa sólo para el modelo 6/4 (Figura R.10A), en concordancia con la mayor cantidad de toxina inyectada en ambos hemisferios (I y C, Figura R.10B) en comparación con el modelo 4/2.

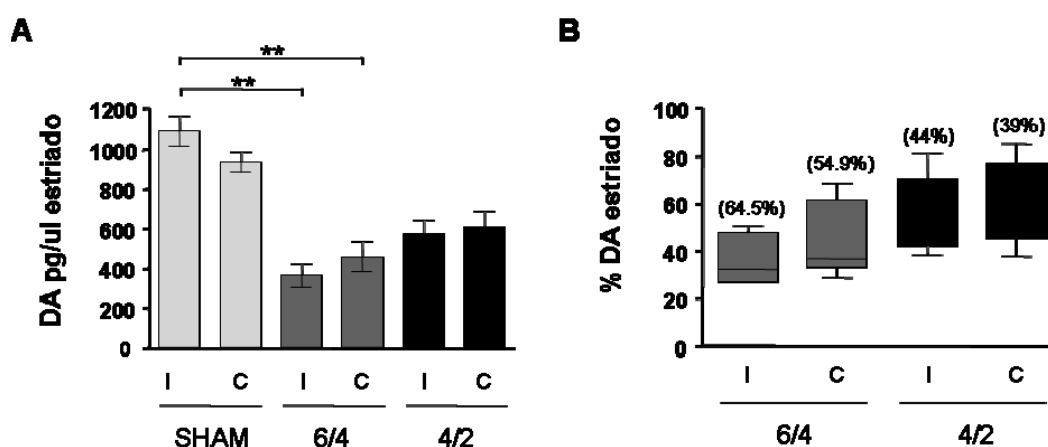


Figura R.10 : Niveles estriatales de dopamina en animales con lesión bilateral asimétrica por 6-OHDA. Se representa gráficamente los niveles de dopamina (DA) tres semanas posterior a la cirugía de lesión bilateral con 6-OHDA en MFB, ya sea **(A)** los niveles totales de DA (pg/ μ l) donde se muestra la media \pm SEM **p < 0.001; según Kruskal-Wallis seguido del post teste Dunn para comparaciones múltiples en comparación con el estriado ipsilateral del grupo SHAM (n=6); ó bien **(B)** el porcentaje medio de depleción dopaminérgica (entre paréntesis) en relación a los datos del grupo SHAM (100%). I: ipsilateral; C: contralateral.

Para determinar si la disminución de los niveles de DA se debieron a la muerte neuronal dopaminérgica o al aumento de actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo (*i.e.* recambio) de DA, se midieron los niveles de los metabolitos DOPAC y HVA (ver M.8.3) en ambos hemisferios.

Del análisis individual de cada metabolito se observó que sus niveles en ambos modelos resultaron similares, tanto en el hemisferio ipsilateral como en el contralateral, al compararlos con el grupo control (Figura R.11A). Sin embargo, la valoración de la relación $[HVA+DOPAC]/DA$ que refleja el recambio dopaminérgico, mostró que el modelo 6/4 presenta diferencias significativas con ambos hemisferios del grupo control (Figura R.11B). En conjunto, estos resultados confirmarían que la disminución de DA ocurre por muerte neuronal dopaminérgica y no por un aumento en la actividad enzimática de MAO y COMT, debido a que individualmente sus metabolitos no varían, y por tanto el incremento de la relación $[HVA+DOPAC]/DA$ indicaría más bien la disminución de la dopamina.

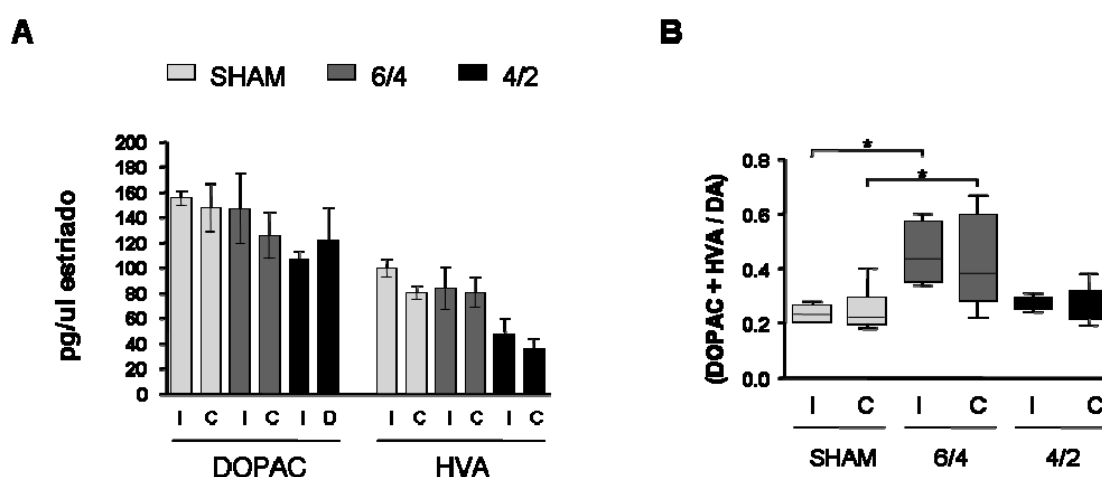


Figura R.11: Niveles estriatales de los metabolitos de dopamina en animales con lesión bilateral asimétrica inducida por 6-OHDA. Se presentan los efectos tras 3 semanas de la lesión dopaminérgica bilateral de los modelos 6/4 y 4/2 sobre los niveles estriatales de los metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC; producto de la oxidación de DA por acción de la MAO) y el ácido homovanílico (HVA; producto final del metabolismo de DA mediado por la MAO y COMT). Estos metabolitos fueron analizados (A) individualmente en cada hemisferio (*i.e.* I, ipsilateral y C, contralateral) y (B) en conjunto (*i.e.* $[DOPAC+HVA]/DA$) para valorar el recambio dopaminérgico. Se muestra la media \pm SEM; * $p < 0.05$ según Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann Whitney en comparación con el grupo SHAM (N=6).

Por otra parte, también se determinaron en estriado de ambos hemisferios las concentraciones de serotonina (5-HT) y su metabolito el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). En el análisis individual de cada uno de estos compuestos comparándolos con su respectivo hemisferio en el grupo control, no se observaron diferencias significativas en los niveles estriatales de 5-HT para ninguno de los modelos estudiados (*i.e.* 6/4 y 4/2 en Figura R.12A). Sin embargo, para ambos hemisferios del modelo 6/4 se registró un aumento significativo del metabolito 5-HIAA en relación al correspondiente hemisferio del grupo control (Figura R.12A).

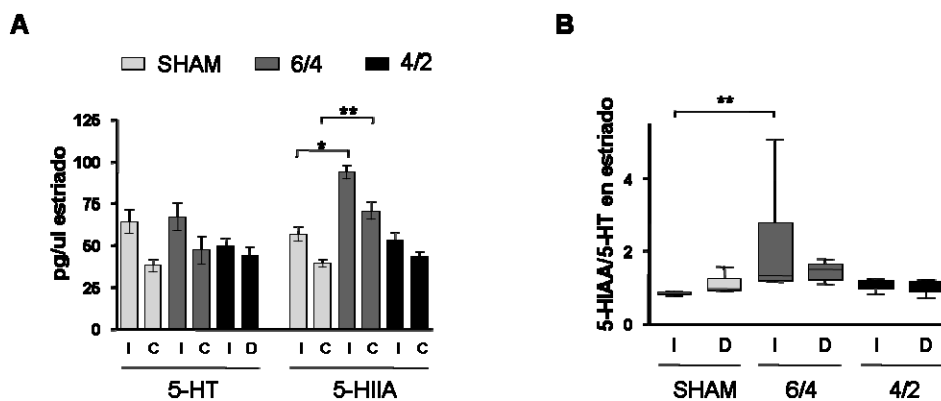


Figura R.12: Niveles estriatales de 5-HT y 5-HIAA en animales con lesión dopaminérgica bilateral. Se presentan los niveles de serotonina (5-HT) y su metabolito el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) en estriado de ratas tras 3 semanas de lesión dopaminérgica bilateral asimétrica inducida por 6-OHDA (*i.e.* 6/4 ó 4/2). **(A)** Comparación individual de 5-HT y 5-HIAA en ambos hemisferios (*i.e.* I: ipsilateral; C: contralateral) con el grupo control (SHAM). Se muestra la media \pm SEM (N=6). En **(B)** se presenta el recambio de 5-HT valorado según la relación 5-HIAA/5-HT y la comparación de los modelos 6/4 y 4/2 con el grupo control (SHAM). Se muestra la media \pm SD $**p < 0.01$ en comparación con el hemisferio correspondiente en SHAM (N=6) según Kruskal-Wallis seguido del test de Mann-Whitney

De manera similar a lo descrito para la DA, el recambio de 5-HT puede ser valorado según la relación 5-HIAA/5-HT (Figura R.12B). Se observó que solo el hemisferio con mayor dosis de 6-OHDA del modelo 6/4 presentó un aumento significativo del recambio de 5-HT ($p < 0.01$) comparado con su correspondiente hemisferio en el grupo SHAM. Contrariamente a lo observado con la DA, estos datos nos permite inferir que el aumento de recambio de 5-HT en estriado del modelo 6/4 se debe a un incremento

de la actividad enzimática de MAO, dada la invariabilidad observada para 5-HT y el aumento de su metabolito 5-HIAA (Figura R.12).

Finalmente, con el objetivo de valorar las posibles alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica de la corteza prefrontal (CPF) como consecuencia de la administración de 6-OHDA, valoramos también DA y 5-HT y sus respectivos metabolitos en esta región.

Como se esperaba, los niveles de DA en la CPF son mucho más bajos que en el estriado (ver niveles de DA [~ 1000 pg/ μ l] en Figura R.10A) tanto para el grupo SHAM como para los dos modelos bilaterales estudiados (Figura R.13A).

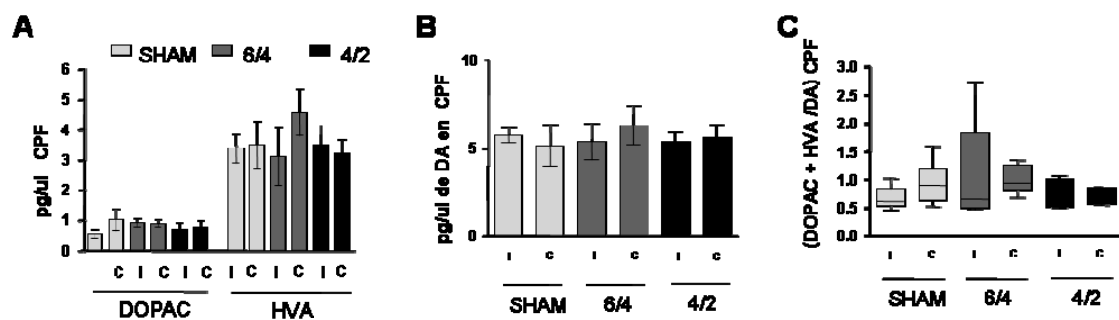


Figura R.13: Niveles de DA y sus respectivos metabolitos en la CPF de los animales con lesión bilateral asimétrica inducida por 6-OHDA. Se presentan los efectos tras 3 semanas de la lesión dopaminérgica bilateral de los modelos 6/4 y 4/2 sobre los niveles de (A) DA, (B) DOPAC y HVA analizados de manera individual en cada hemisferio (*i.e.* I, ipsilateral y C, contralateral) y (C) [DOPAC+HVA]/DA para valorar el recambio dopaminérgico. Se muestra la media \pm SEM (N=6).

De manera similar, tanto los niveles de DOPAC y HVA (Figura R.13B); como los niveles de 5-HT y su metabolito (Figura R.14A) en la CPF no se vieron afectados por la inyección bilateral asimétrica de 6-OHDA.

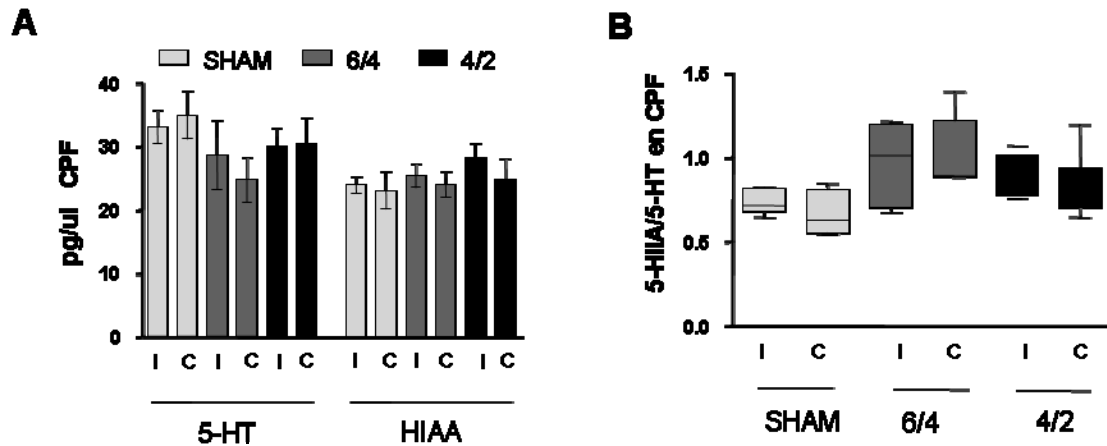


Figura R.14 : Niveles de 5-HT y 5-HIAA en la CPF de los animales con lesión dopaminérgica bilateral asimétrica. Se presentan los niveles de serotonina (5-HT) y su metabolito el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) en la CPF de ratas tras 3 semanas de lesión dopaminérgica bilateral asimétrica inducida por 6-OHDA (*i.e.* 6/4 ó 4/2). **(A)** Comparación individual de 5-HT y 5-HIAA en ambos hemisferios (*i.e.* I: ipsilateral; C: contralateral) con el grupo control (SHAM). Se muestra la media \pm SEM (N=6). En **(B)** se presenta el recambio de 5-HT valorado según la relación 5-HIAA/5-HT y la comparación de los modelos 6/4 y 4/2 con el grupo control (SHAM). Se muestra la media \pm SD en comparación con el hemisferio correspondiente en SHAM (N=6).

R.12. Caracterización neuropsiquiátrica de ratas con lesión dopaminérgica bilateral asimétrica : anhedonia

Con el objetivo de estudiar el posible efecto de las alteraciones observadas en la determinación de dopamina (DA) y serotonina (5-HT) estriatales, se valoró el grado de anhedonia de los animales lesionados a través del test de preferencia a la sucrosa (ver M.8.2).

Tal y como se observa en la Figura R.15A, el modelo bilateral 6/4 presentó una disminución significativa en la preferencia a la sucrosa cuando se compara con el grupo control, sugiriendo la existencia de un cierto grado de anhedonia. Para dilucidar si estos resultados están en concordancia con las alteraciones de los neurotransmisores analizados, se correlacionó el consumo de sucrosa de cada animal

con su respectivo patrón del metabolismo de la 5-HT estriatal (Figura R.15B), ya que es sabido que el sistema serotoninérgico está implicado en procesos emocionales [237]. Se observó una correlación negativa y significativa entre el consumo de sucrosa y el recambio de 5-HT (Figura R.16B), indicando que a menor disponibilidad estriatal de 5-HT (*i.e.* mayor recambio de 5-HT), mayor es el grado de anhedonia (*i.e.* menor consumo de sucrosa).

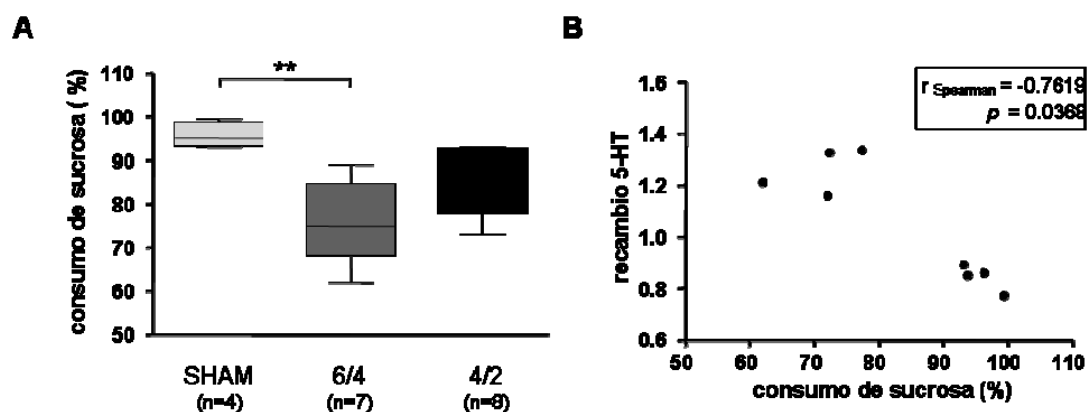


Figura R.15: Efecto de la inyección bilateral asimétrica de 6-OHDA sobre el consumo de sucrosa y correlación con el recambio de serotonina. (A) Se presenta el consumo de sucrosa durante 48 hrs en relación al grupo control (SHAM = 100%) en animales tras 3 semanas de la cirugía para la lesión 6/4 ó 4/2 con 6-OHDA. Se muestra la media \pm SD; $**p < 0.01$ respecto a SHAM según Kruskal-Wallis. (B) Correlación de Spearman entre el consumo de sucrosa (%) y el recambio de 5HT estriatal (*i.e.* 5HIA/5-HT) de los grupos SHAM (N=4) y 6/4 (N=4).

R.13. Caracterización motora del modelo bilateral asimétrico de lesión dopaminérgica

Debido a que el modelo 6/4 presentó alteraciones emocionales (*i.e.* anhedonia), para la posterior valoración del comportamiento cognitivo se escogió el modelo 4/2 como posible modelo pre-motor de la EP.

Por tal motivo, previo a la futura aplicación de la batería cognitiva[‡], se valoró la actividad motora por actimetría (ver M.8.1).

Se observó que tanto la actividad motora horizontal, como la actividad motora vertical (*rearing*s) no se vieron afectadas por la lesión (Figura R.16).

[‡] Conjunto de tests de comportamiento que valoran diferentes dominios cognitivos

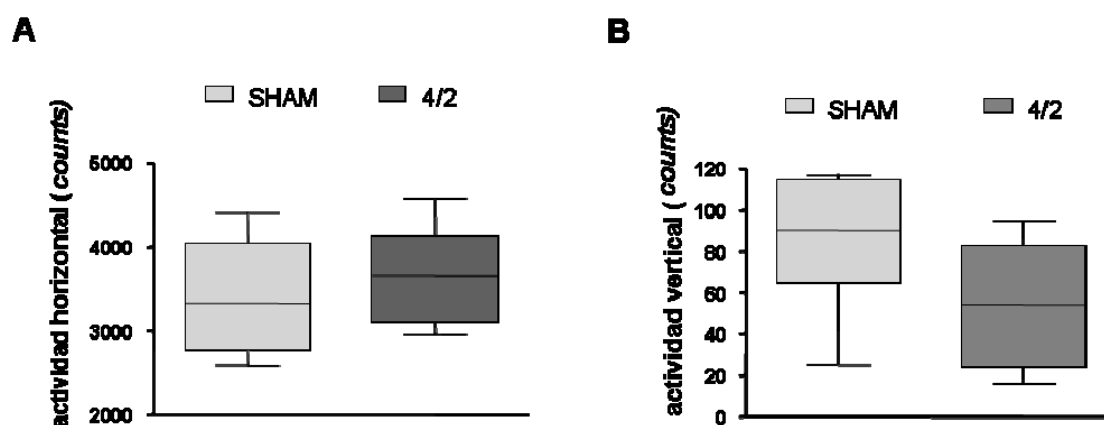


Figura R.16: Efecto de la inyección bilateral asimétrica de 6-OHDA sobre la actividad motora del modelo 4/2 (A) Se presenta el número de *counts* de la actividad motora horizontal como parámetro de desplazamiento y (B) número de *counts* de la actividad motora vertical como parámetro de la actividad exploratoria. Se muestra la media \pm SEM (N=7)

DISCUSIÓN

En la actualidad no existen modelos de parkinsonismo en roedores que reproduzcan fielmente el deterioro cognitivo en los estadios tempranos de la enfermedad de Parkinson (EP) y la transición de dicho deterioro a etapas más avanzadas.

En el trabajo de la presente tesis doctoral se buscó caracterizar el perfil cognitivo del modelo de rata hemiparkinsoniana, el mismo modelo utilizado en el estudio de las alteraciones motoras en la EP

El modelo de la neurodegeneración dopaminérgica unilateral mediante la administración de neurotoxinas como la 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (MFB, del inglés. *medial forebrain bundle*), ha sido extensamente utilizado para el estudio de estrategias terapéuticas tanto para el tratamiento de síntomas motores como la prevención de discinesias inducidas por L-DOPA [31]. En esta línea y utilizando este modelo, nuestro grupo demostró que la adición de una lesión noradrenérgica a la lesión dopaminérgica, no modifica la magnitud o el patrón de respuesta motora a antagonistas adenosinérgicos, aunque es capaz de disminuir selectivamente el umbral de respuesta motora a L-DOPA (ver ANEXO I y II).

En conjunto, los resultados indican que fuimos capaces de relacionar un patrón de degeneración dopaminérgica unilateral similar al que podría observarse en las fases tempranas de la EP, con los déficits cognitivos característicos de dicha etapa.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la EP se manifiesta inicialmente con una progresión asimétrica de neurodegeneración, con mayores déficits dopaminérgicos en un hemisferio respecto al otro. Por lo tanto, un modelo unilateral de lesión dopaminérgica quizás no sea capaz de reproducir del todo las fases pre-motoras de la EP donde el componente cognitivo ya se vea afectado, tal y como se observó en la prueba del cambio de set atencional donde la lesión unilateral no afectó el rendimiento de las ratas de la misma manera que lo observado en los pacientes con EP cuando realizan la prueba análoga (*i.e. Wisconsin Card Sort Test, WCST*). De acuerdo a esto último, esta tesis doctoral también desarrolló modelos bilaterales de lesión dopaminérgica asimétrica inducida por dosis moderadas y leves de 6-OHDA,

estableciendo los modelos 6/4 y 4/2 que serán discutidos con posterioridad al modelo unilateral.

El patrón de degeneración dopaminérgica del modelo unilateral mostró un cierto grado de paralelismo con lo observado en pacientes parkinsonianos de estadios tempranos de la enfermedad, donde la pérdida neuronal de la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc) es de mayor extensión que en la área tegmental ventral (VTA). Puesto que las proyecciones nigroestriadas de la rata son similares a los humanos, nuestros resultados fueron coherentes al observarse una mayor pérdida dopaminérgica en el estriado dorsal respecto del ventral (ver Figura R.1B) y en la corteza pre-frontal (CPF) del hemisferio ipsilateral (concretamente la zona dorsal de la CPF medial, ver Figura1C).

Existe una analogía entre la corteza prefrontal dorsolateral (CPF-DL) en humanos y la zona media de la CPF en ratas(mCPF), la cual está dividida en región dorsal (formada por la corteza cingulada anterior), región ventral (constituída por las zonas infralímbica y prelímbica), y la región medial orbital [238] (Figura D.1).

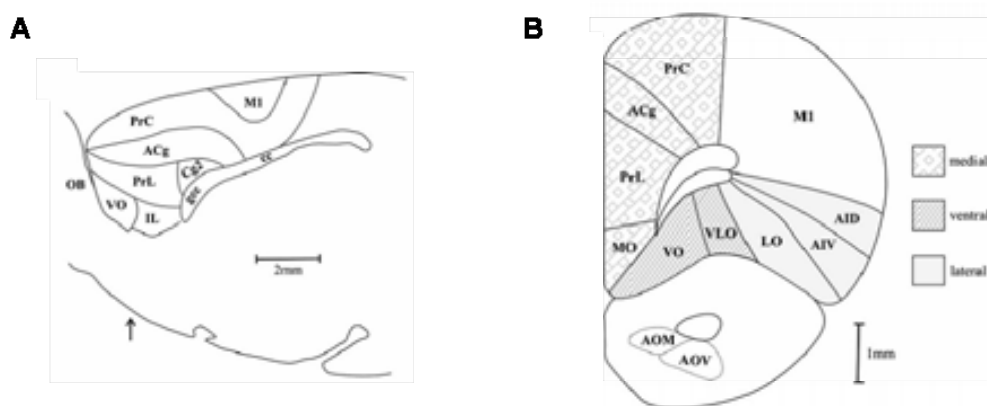


Figura. D1. Diagramas de la corteza prefrontal de la rata a) Sección sagital b) Sección coronal unilateral -3.5 mm AP rostral a bregma. Los diferentes sombreados muestran tres subdivisiones de la corteza prefrontal (medial, ventral y lateral) : AID y AIV, corteza insular dorsal y ventral; AOM y AOV, núcleo olfatorio anterior medial y ventral; cc, cuerpo caloso; ACg, corteza cingulada anterior; gcc, genu del cuerpo caloso; MO, LO, VLO y VO corteza orbital medial,lateral, ventrolateral y ventral; M1, área motora primaria;PrC, área motora secundaria ; IL y PrL, corteza infralímbica y prelímbica; OB, bulbo olfatorio. {Dalley, 2004 #388

Como en los humanos, las distintas zonas de la mCPF de la rata participan en diferentes funciones cognitivas, por lo que en la prueba del cambio de set atencional es evidente que tanto una alteración de la expresión del transportador de dopamina (DAT) en la zona dorsal de la mCPF (*i.e.* corteza cingulada anterior, ver Figura R.1 y D.1), así como una alteración en la modulación de los receptores dopaminérgicos en la CPF (ver Figura R.9), podrían relacionarse con la alteración observada en la discriminación intradimensional (ID) y en la discriminación extradimensional (ED) de las ratas lesionadas en comparación con el grupo SHAM. Estos resultados están en concordancia con lo descrito previamente, donde una lesión directa del cortex cingulado anterior – región que recibe proyecciones provenientes del estriado dorsal medial afectado en nuestro modelo unilateral (ver Figura R.1) – provoca una alteración en el cambio intradimensional (IDS) [193]. Es interesante observar que los pacientes con EP sin demencia presentan déficits selectivos en el rendimiento del cambio de set valorado según el WCST y que se especula que puede ser debido a la combinación de deficiencias de dopamina nigroestriatal y mesocortical [137, 239]. Sin embargo, en el modelo de lesión dopaminérgica unilateral inducido por 6-OHDA no observamos diferencias entre los rendimientos del ID y del ED, que en condiciones normales debería poseer peor rendimiento que la tarea que le precede, el ID. En la fase del ID las ratas tienen la oportunidad de aprender que una dimensión (*i.e.* textura o medio de escarbado) consistentemente le da la recompensa, mientras que la otra dimensión no, en un proceso conocido como “formación del set atencional”, es decir, una serie de reglas (set) que le llevan a la recompensa. En la fase ED, la dimensión previamente asignada como correcta (*i.e.* que le da la recompensa), se asigna como incorrecta, lo que implica un esfuerzo adicional por parte del animal para abandonar el set aprendido en el ID y aprender una nueva regla, en un proceso conocido como “cambio de set”. A pesar de ello, las ratas unilateralmente lesionadas en MFB parecen no evidenciar alteración en el cambio de set, ya que en el mismo grupo de ratas lesionadas no se observa un peor rendimiento del ED frente al ID, a pesar que el ED lo hagan peor que

el ED del grupo control (ver Figura R.5). Ante la falta de déficits en el rendimiento del ED frente al ID, (pero conl empeoramiento significativo de ambas pruebas respecto al grupo control), es posible inferir que la lesión dopaminérgica establecida en MFB por 6-OHDA altera negativamente tanto la habilidad del animal para formar un set atencional, como para que no existan diferencias entre ID y ED.

Es importante señalar que con estos datos todavía no podemos descartar la posibilidad de una respuesta perseverativa como causante de los errores observados en la ejecución de estas tareas, y por ello se deberían realizar otras pruebas de comportamiento que corroboren la disfunción en la formación del set, entre ellas el “test del tiempo de reacción a cinco elecciones” (ver. I.9.1.5), el cual además de evaluar la atención y grado de impulsividad del animal, evalúa también la perseverancia.

En este punto cabe mencionar que la prueba de cambio de set atencional requiere de una exhaustiva optimización para su correcta aplicación. Además, aunque este test ha sido utilizado y validado en modelos murinos con lesiones de la CPF, en el momento que se implementó dicho test en nuestro laboratorio aún no se había utilizado y validado en ratas para valorar posibles alteraciones ejecutivas en modelos de parkinsonismo.

Así, si bien esperábamos en las ratas hemiparkinsonianas (debido a la lesión de la vía nigroestriatal) una alteración ejecutiva similar a lo que ocurre en los pacientes con EP (Figura D.2), los resultados de comportamiento obtenidos concuerdan con los hallazgos neuroquímicos (ver R.1), puesto que no hemos observado alteración en la porción ventral de la CPF medial (*i.e.* infralímbica, prelímbica y medial orbital; Figura D.1).

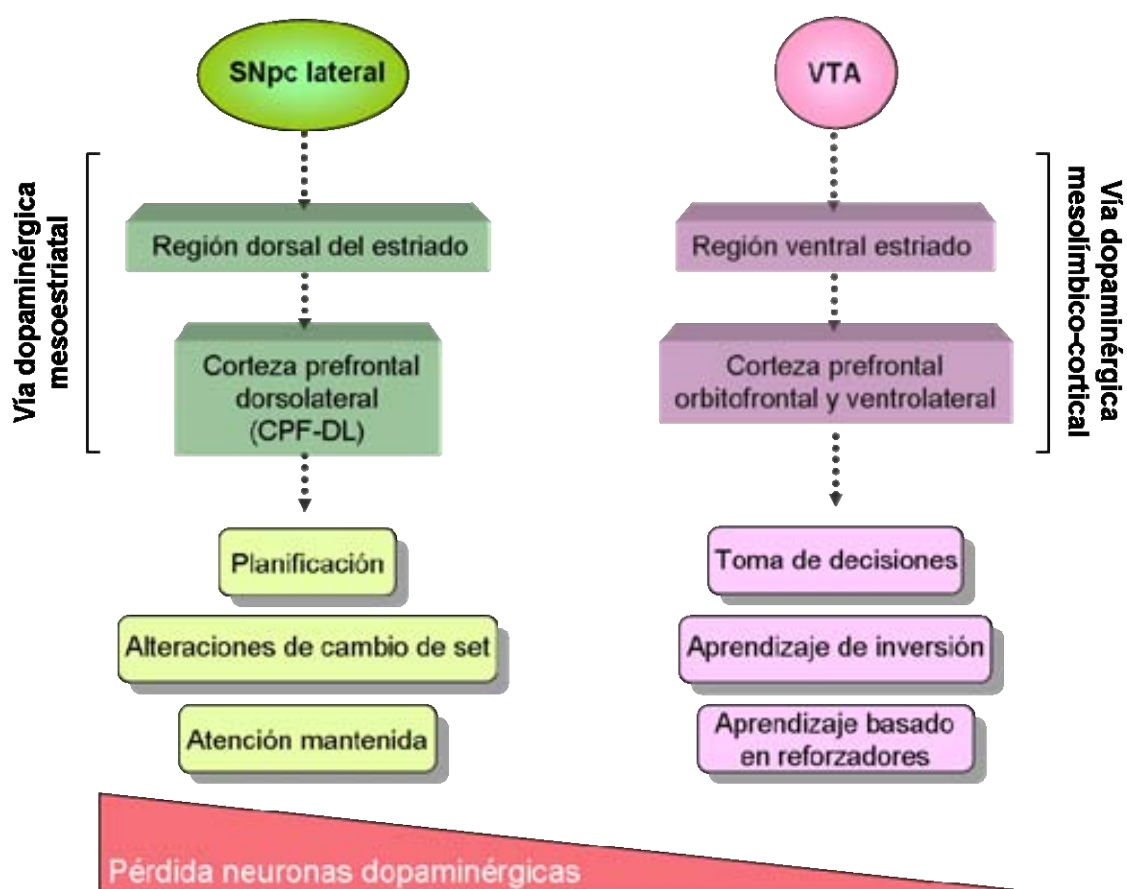


Figura D.2. Proyecciones dopaminérgicas cortico-estriatales en humanos. SNpc, *sustancia nigra pars compacta*; VTA, *área tegmental ventral*

En roedores se ha establecido claramente que la zona ventral de la CPF medial es la que participa en la atención, cambio de set y flexibilidad cognitiva; en tanto que la zona dorsal, es decir, la corteza cingulada anterior, está relacionada con el procesamiento temporal de la información [238] (Figuras D.1 y D.3). En esta misma línea, la ausencia de alteraciones en la porción ventral de la CPF medial también justificaría, en parte, el rendimiento de la memoria de trabajo (evaluada en el laberinto radial de ocho brazos) observado para el modelo unilateral, donde se demostró que la lesión dopaminérgica unilateral no es suficiente para producir alteraciones en este dominio cognitivo (ver R.2).

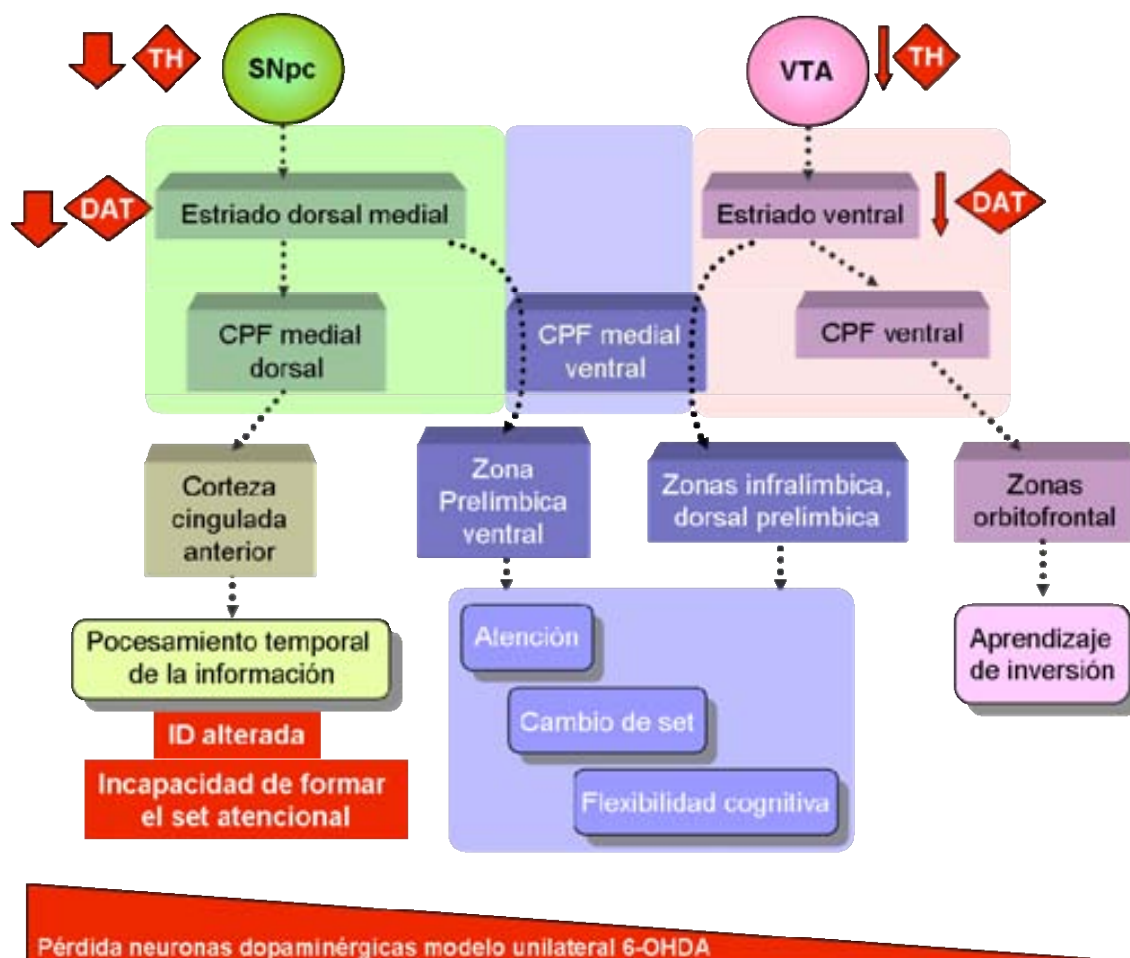


Figura D.3: *Proyecciones dopaminérgicas cortico-estriatales en roedores.* En rojo se indican (1) los cambios neuroquímicos (la fecha indica disminución y su anchura, corresponde a un mayor grado de lesión y (2) los cambios conductuales posteriores a la inyección unilateral de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial.

A pesar que la adquisición del aprendizaje fue más lenta (i.e. los animales lesionados necesitaron mayor número de sesiones para ejecutar la tarea cuando se analizó la progresión del aprendizaje, ver Figura R.2B), la lesión unilateral en MFB inducida por 6-OHDA no influye en la capacidad de los animales para solucionar tareas espaciales que requieran la aplicación de una regla de memoria de trabajo espacial, ni tampoco en la habilidad para utilizar la información espacial a la hora de resolver la tarea.

En este sentido, cabe destacar que en concordancia con nuestros resultados, recientemente se ha demostrado [209] que ratones MitoPark (modelo de parkinsonismo progresivo por alteración mitocondrial de las neuronas dopaminérgicas

mesencefálicas) evaluados mediante el test del laberinto de Barnes, mostraron alteraciones en el aprendizaje, sin verse alterada la memoria espacial.

Estas observaciones coinciden con estudios llevados a cabo en ratones con déficit dopaminérgico y evaluados en el laberinto de Morris [240], que al igual que el laberinto de Barnes y el laberinto de 8 brazos empleado en esta tesis doctoral, son paradigmas más dependientes de la funcionalidad del hipocampo dado su componente espacial [241], aún cuando sean también dependientes de la integridad funcional de la CPF. De hecho, Olton y cols. [242] observaron que ratas con lesión en cualquiera de las conexiones extrínsecas del hipocampo ejecutan de manera deficiente el laberinto radial, en tanto que los animales con lesiones en otras regiones del cerebro como el caudado, amígdala o corteza frontal, realizan correctamente este paradigma.

Si bien en el presente trabajo no se comprobó la integridad del hipocampo en el modelo de lesión dopaminérgica unilateral, la invariabilidad observada por estos animales en la memoria de trabajo puede ser justificada por trabajos de otros grupos. Suzuki y cols [243] observaron que la lesión dopaminérgica unilateral en SNpc inducida por 6-OHDA en ratas producía una disminución de la proliferación celular (*i.e.* neurogénesis) en la zona subgranular del giro dentado ipsilateral a la lesión, pero no era suficiente para alterar la memoria de trabajo espacial evaluada en el laberinto de Morris.

Notablemente, el rendimiento diferencial en las tareas ejecutivas realizadas por los animales con lesión dopaminérgica unilateral en respuesta al tratamiento crónico con L-DOPA (ver R.7 y R.8), apoya las respuestas disociadas atribuidas al grado diferencial de neurodegeneración de los circuitos fronto-subcorticales presentes también en la clínica [131, 169, 174, 175]. En nuestros animales la terapia de reemplazo dopaminérgico crónico supuso una relativa mejoría sobre las funciones dependientes de las regiones de la CPF medial, en tanto que los procesos cognitivos relacionados con la vía mesolímbica no se vieron afectados (*i.e.* aprendizaje de inversión, Figura R.8). Si bien, la relativa preservación de esta vía en pacientes

parkinsonianos de estadios tempranos provoca una sobre-estimulación de la misma por acción de la L-DOPA y el consecuente empeoramiento del aprendizaje de inversión, en el modelo unilateral de lesión dopaminérgica no se observó este efecto, muy probablemente debido a la leve degeneración dopaminérgica observada en el VTA tras la inyección de la 6-OHDA en el MFB. Cabe señalar que los pacientes relativamente estables con EP temprana y tratados con dosis óptimas de L-DOPA, realizan correctamente el aprendizaje de inversión, tal y como es el caso para ratas lesionadas unilateralmente en ausencia de tratamiento y valoradas en la prueba de cambio de set atencional (ver REV en Figura R.5). Esto y sumado a la relativa preservación de la vía mesolímbica de las ratas hemiparkinsonianas (ver Figura R.1), permite sugerir a dicho modelo de lesión dopaminérgica desde el punto de vista cognitivo como potencialmente representativo de los primeros estadios de la EP, puesto que el VTA, el estriado ventral y las vías fronto-subcorticales relacionadas también se encuentran relativamente preservadas durante los estadios tempranos e intermedios de la enfermedad [173] (Figura D.2).

Por otra parte, en el modelo unilateral de lesión dopaminérgica se observó una mejoría en la memoria de trabajo y en el cambio de set intradimensional (IDS) en respuesta al tratamiento crónico con L-DOPA. Como se ha explicado con anterioridad, ambas tareas ejecutivas son dependientes de la neurotransmisión dopaminérgica y de acuerdo a nuestros resultados, dicha mejoría podría explicarse no sólo por el aumento de la relación ipsi/contralateral para los niveles del transcrito del receptor de dopamina D5 (DrD5), si no también por la mayor inmunoreactividad para el transportador de dopamina (DAT) observada en el hemisferio contralateral. Así, la probable sobreexpresión de DAT en el hemisferio contralateral conllevaría a que ocurriera una mayor conversión de L-DOPA a dopamina (DA) en este hemisferio, y el concomitante aumento de DA extracelular provocaría una disminución de los receptores DrD5 en la CPF contralateral (Anexo III). Es interesante tener en cuenta que en ratas hemiparkinsonianas tratadas sólo con vehículo, se observa una disminución

generalizada en la relación ipsi/contralateral de los transcritos en CPF de los receptores dopaminérgicos (en particular DrD5; Figura R.9) debido principalmente a una disminución de los niveles de mRNA de dichos receptores en el hemisferio lesionado (Anexo III). Además, la inmunoreactividad reducida observada en la corteza cingulada anterior ipsilateral, produciría una disminución de la recaptación de DA con el consiguiente aumento de sus niveles extracelulares. El resultado final de dicho aumento sería la infraexpresión de los receptores de dopamina, de manera similar a lo descrito para la respuesta compensatoria a la lesión en el hemisferio contralateral tras el tratamiento crónico con L-DOPA. Esto ya ocurre en humanos, ya que en la EP se han asociado altos niveles de DAT con una disminución de la recaptación de DA en un mecanismo neuroprotector que intenta mantener relativamente constante los niveles sinápticos de dicho neurotransmisor, preservando así los terminales dopaminérgicos aún funcionales [244] . Este fenómeno ocurriría en etapas pre-motoras de la enfermedad, por tanto el modelo en rata de lesión dopaminérgica en MFB podría, eventualmente, reproducir los mecanismos compensatorios de los estadios tempranos de la EP, aunque para ello se requiere profundizar en el estudio de modulación molecular para otros neurotransmisores y sus correspondientes receptores y/o transportadores.

Adicionalmente a estos perfiles de expresión en la CPF de los receptores dopaminérgicos, pudimos establecer una significativa correlación inversa entre la expresión de DrD5 en la CPF y el número de intentos para cada fase de la prueba del cambio de set atencional (Tabla R.2), corroborando así que los efectos beneficiosos de la L-DOPA en el rendimiento ejecutivo del modelo unilateral estaría mediado por este receptor dopaminérgico.

Con todo ello, queda patente que la asimetría intrínseca a este modelo de lesión unilateral en MFB inducido por 6-OHDA probablemente favorezca la acción de la L-DOPA sobre las tareas ejecutivas discutidas en este trabajo.

Finalmente para el modelo de lesión dopaminérgica unilateral, se observó preservación de los procesos mnésicos cuya alteración se asocia a estadios más avanzados de la EP, evaluados como la memoria de reconocimiento (o memoria visuoespacial) en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR, ver Figura R.3), tal y como se ha demostrado previamente [71]. Estos resultados indicarían la probable preservación de mecanismos no dopaminérgicos (glutamatérgicos y colinérgicos) cuya descompensación estaría en mayor asociación a la transición hacia demencia en pacientes con EP avanzado [200]. Sin embargo, en el presente trabajo no se valoró ni neuroquímica ni molecularmente la integridad de dichos sistemas y por tanto, no podemos afirmar que estén intactos. Estudios futuros deberán contemplar la valoración de los sistemas mencionados tanto en el modelo unilateral como en los modelos bilaterales asimétricos establecidos en este trabajo.

Como se mencionó anteriormente, la implementación de la prueba de cambio de set atencional tuvo lugar en ausencia de cualquier trabajo publicado con anterioridad para modelos de parkinsonismo, aunque recientemente se ha publicado la evaluación de cambio de set en un modelo bilateral de 6-OHDA [72]. Sin embargo, en este trabajo no se menciona la ausencia de motivación y/o alteraciones olfatorias que pudieran interferir en la interpretación de los resultados. En nuestro caso, la evaluación de dichos parámetros antes de la aplicación de la prueba de cambio de set atencional, constituyó una herramienta fundamental para demostrar la utilidad de esta prueba en nuestros modelos de estudio. Tuvimos especial interés en las posibles alteraciones olfatorias, dada la discreta degeneración dopaminérgica en VTA para el modelo unilateral (ver Fig R.1; aún debe comprobarse en los modelos bilaterales asimétricos). Dicho núcleo constituye la mayor fuente de proyecciones dopaminérgicas hacia el bulbo olfatorio y otras regiones mesolímbicas [84], por lo que era de esperar una alteración en dicha modalidad sensorial, al menos en el modelo unilateral (ver Figura R.4B). Es por ello que se adaptó el test de cambio de set atencional y en vez del

olfato, se utilizaron otras dimensiones sensoriales perceptuales, como la textura y el medio de escarbado, tal y como se describe en el protocolo de McAlonan y cols [195].

En relación al grado de motivación, contrariamente a los animales denervados de manera unilateral y al modelo bilateral con menor lesión (modelo 4/2), los animales del modelo bilateral 6/4 exhibieron un claro grado de anhedonia en la prueba de preferencia a la sucrosa (ver Figura R.15A). Este síntoma neuropsiquiátrico es también característico de cierto porcentaje de pacientes con EP y podría explicarse por el aumento del recambio de serotonina (5-HT) estriatal observado en el modelo 6/4, dado el reconocido papel del sistema serotoninérgico en los procesos emocionales.

Si bien en este trabajo doctoral al modelo 6/4 no se le ha caracterizado del todo su perfil cognitivo, no descartamos estudiar con mayor profundidad los rasgos neuropsiquiátricos del mismo, ampliando el número de pruebas de comportamiento para una mejor valoración de dichos trastornos. Esto incluye la prueba de nado forzado (*forced swimming test*), cuyo uso también se aplica para valorar anhedonia.

La ausencia de alteraciones motoras en los modelos de lesión dopaminérgica, tanto unilateral como bilateral, utilizados para el desarrollo del presente trabajo permitirían ubicarlos como modelos pre-motores. Sin embargo, la condición de asimetría bilateral y la caracterización neuroquímica (en particular el porcentaje de pérdida dopaminérgica estriatal) nos condujo a plantearnos que los modelos bilaterales serían modelos más adecuados para el estudio de las características cognitivas presentes en los estadios premotores. Mientras el modelo bilateral con mayor daño dopaminérgico podría constituir un modelo para el estudio de los síntomas neuropsiquiátricos, el modelo bilateral con menor lesión sería un modelo más prometedor para el estudio de alteraciones cognitivas relacionadas a estadios tempranos, que actualmente se están valorando en nuestro laboratorio.

Así, consideramos usar los modelos bilaterales en el futuro para: (i) el estudio de los mecanismos moleculares y celulares de los procesos patológicos tempranos no sólo del sistema dopaminérgico nigroestriatal sino también de otros sistemas

neuroquímicos cerebrales comprometidos en la EP, (ii) la valoración de los mecanismos de plasticidad neuronal que conllevan a la compensación del fallo del sistema dopaminérgico nigroestriatal, (iii) la búsqueda de biomarcadores periféricos de los estadios presintomáticos de parkinsonismo y (iv) el desarrollo de terapias preventivas y/o celulares regenerativas utilizando este modelo como huésped de neuronas derivadas de iPS (*induced pluripotential stem cells*).

CONCLUSIONES

1. La inyección unilateral de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial reproduce el patrón de degeneración dopaminérgica relacionada con los estadios cognitivos tempranos de la enfermedad de Parkinson, donde hay una mayor afectación de la vía dopaminérgica mesoestriatal respecto a la vía dopaminérgica mesolímbico-cortical. Dicha degeneración diferencial se refleja en el rendimiento de los animales lesionados en las distintas pruebas de comportamiento desarrolladas en este trabajo.

2. Las posibles alteraciones motoras del modelo de lesión dopaminérgica unilateral no influyen en el desarrollo de las pruebas de comportamiento para evaluar de forma diferencial dominios ejecutivos afectados y dominios mnésicos preservados.

3. La inyección unilateral de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial afecta diferencialmente las zonas de la corteza prefrontal medial de la rata influyendo en su rendimiento cognitivo. Así, la afectación de la zona dorsal de la corteza medial influye negativamente en la formación del set, mientras que la preservación de la memoria de trabajo concuerda con la preservación de la zona ventral de la corteza medial.

4. La mejora de las funciones ejecutivas de los animales con degeneración dopaminérgica unilateral en respuesta al tratamiento crónico con L-DOPA se correlaciona con la sobreexpresión en la corteza prefrontal del receptor dopaminérgico perteneciente a la familia de receptores dopaminérgicos D1, el receptor dopaminérgico D5.

5. La respuesta molecular al tratamiento crónico con L-DOPA en el modelo de la rata hemiparkinsoniana está mediada por mecanismos compensatorios para la transmisión dopaminérgica, donde participan los receptores dopaminérgicos y el transportador de dopamina.

6. La presente tesis doctoral desarrolló y caracterizó bioquímicamente dos modelos bilaterales asimétricos de degeneración dopaminérgica, observándose en ambos una disminución de la producción de dopamina y un aumento del recambio de serotonina.

7. Los modelos bilaterales generados en esta tesis doctoral muestran una degeneración dopaminérgica asimétrica, con disminución de dopamina estriatal menor del 70% y ausencia de alteraciones motoras, que reproduce por primera vez en el modelo de rata con lesión dopaminérgica inducida por 6-OHDA, los estadios premotores de la enfermedad de Parkinson.

8. La denervación asimétrica bilateral de la vía dopaminérgica nigroestriatal inducida con dosis moderadas de 6-OHDA se acompaña de alteraciones serotoninérgicas que correlacionan con alteraciones emocionales. En consecuencia, dicho modelo sería potencialmente adecuado para el estudio de trastornos neuropsiquiátricos característicos del período premotor de la enfermedad de Parkinson.

BIBLIOGRAFÍA

1. de Lau, L.M. and M.M. Breteler, *Epidemiology of Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2006. **5**(6): p. 525-35.
2. Wirdefeldt, K., et al., *Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence*. *Eur J Epidemiol*, 2011. **26 Suppl 1**: p. S1-58.
3. Hughes, A.J., et al., *Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1992. **55**(3): p. 181-4.
4. Lees, A.J., J. Hardy, and T. Revesz, *Parkinson's disease*. *Lancet*, 2009. **373**(9680): p. 2055-66.
5. Djaldetti, R., I. Ziv, and E. Melamed, *The mystery of motor asymmetry in Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2006. **5**(9): p. 796-802.
6. Chaudhuri, K.R., D.G. Healy, and A.H. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management*. *Lancet Neurol*, 2006. **5**(3): p. 235-45.
7. Tolosa, E. and C. Pont-Sunyer, *Progress in defining the premotor phase of Parkinson's disease*. *J Neurol Sci*, 2011. **310**(1-2): p. 4-8.
8. Ross, G.W., et al., *Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 2008. **63**(2): p. 167-73.
9. Langston, J.W., *The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg*. *Ann Neurol*, 2006. **59**(4): p. 591-6.
10. Fasano, A., A. Daniele, and A. Albanese, *Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(5): p. 429-42.
11. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. *Nature*, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
12. Jellinger, K.A., *Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts*. *Mov Disord*, 2012. **27**(1): p. 8-30.
13. Shulman, J.M., P.L. De Jager, and M.B. Feany, *Parkinson's disease: genetics and pathogenesis*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 193-222.
14. Stern, M.B., A. Lang, and W. Poewe, *Toward a redefinition of Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2012. **27**(1): p. 54-60.
15. Lim, S.Y., S.H. Fox, and A.E. Lang, *Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease*. *Arch Neurol*, 2009. **66**(2): p. 167-72.
16. Braak, H., et al., *Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology*. *Neurosci Lett*, 2006. **396**(1): p. 67-72.
17. Fearnley, J.M. and A.J. Lees, *Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity*. *Brain*, 1991. **114 (Pt 5)**: p. 2283-301.
18. Agid, Y., *Parkinson's disease: pathophysiology*. *Lancet*, 1991. **337**(8753): p. 1321-4.
19. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's disease: mechanisms and models*. *Neuron*, 2003. **39**(6): p. 889-909.
20. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. *Neurobiol Aging*, 2003. **24**(2): p. 197-211.
21. Burke, R.E., W.T. Dauer, and J.P. Vonsattel, *A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 2008. **64**(5): p. 485-91.
22. Jellinger, K.A., *Critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 2010. **67**(4): p. 550.
23. Terzioglu, M. and D. Galter, *Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models*. *FEBS J*, 2008. **275**(7): p. 1384-91.
24. Duty, S. and P. Jenner, *Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(4): p. 1357-91.

25. Taylor, T.N., J.G. Greene, and G.W. Miller, *Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease*. Behav Brain Res, 2010. **211**(1): p. 1-10.
26. Dawson, T.M., H.S. Ko, and V.L. Dawson, *Genetic animal models of Parkinson's disease*. Neuron, 2010. **66**(5): p. 646-61.
27. Meredith, G.E. and U.J. Kang, *Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem*. Mov Disord, 2006. **21**(10): p. 1595-606.
28. Bezard, E., et al., *Animal models of Parkinson's disease: Limits and relevance to neuroprotection studies*. Mov Disord, 2012.
29. Beal, M.F., *Parkinson's disease: a model dilemma*. Nature, 2010. **466**(7310): p. S8-10.
30. Fernandes, V.S., et al., *Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease*. Behav Brain Res, 2012. **231**(1): p. 154-63.
31. Bove, J. and C. Perier, *Neurotoxin-based models of Parkinson's disease*, in *Neuroscience*. 2012. p. 51-76.
32. Cicchetti, F., J. Drouin-Ouellet, and R.E. Gross, *Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?* Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(9): p. 475-83.
33. Beal, M.F., *Experimental models of Parkinson's disease*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(5): p. 325-34.
34. Choi, W.S., R.D. Palmiter, and Z. Xia, *Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model*. J Cell Biol, 2011. **192**(5): p. 873-82.
35. Sherer, T.B., et al., *Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease*. J Neurosci, 2003. **23**(34): p. 10756-64.
36. Betarbet, R., et al., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nat Neurosci, 2000. **3**(12): p. 1301-6.
37. Tansey, M.G. and M.S. Goldberg, *Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention*. Neurobiol Dis, 2010. **37**(3): p. 510-8.
38. Blesa, J., et al., *Classic and new animal models of Parkinson's disease*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 845618.
39. Manning-Bog, A.B., et al., *The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein*. J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 1641-4.
40. Ossowska, K., et al., *Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: implications for Parkinson's disease*. Neuroscience, 2006. **141**(4): p. 2155-65.
41. McCormack, A.L., et al., *Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat*. Neurobiol Dis, 2002. **10**(2): p. 119-27.
42. Heikkila, R.E., A. Hess, and R.C. Duvoisin, *Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice*. Science, 1984. **224**(4656): p. 1451-3.
43. Bezard, E., et al., *Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter*. Exp Neurol, 1999. **155**(2): p. 268-73.
44. Chan, P., et al., *Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain*. J Neurochem, 1991. **57**(1): p. 348-51.
45. Rossetti, Z.L., et al., *1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in vitro*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(23): p. 4573-4.
46. Giovanni, A., P.K. Sonsalla, and R.E. Heikkila, *Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(3): p. 1008-14.

47. Staal, R.G. and P.K. Sonsalla, *Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **293**(2): p. 336-42.
48. Prediger, R.D., et al., *Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1170**: p. 629-36.
49. Da Cunha, C., et al., *Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia*. Behav Brain Res, 2001. **124**(1): p. 9-18.
50. Przedborski, S. and M. Vila, *The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **991**: p. 189-98.
51. Perier, C., et al., *Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8161-6.
52. Fornai, F., et al., *Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3413-8.
53. Petroske, E., et al., *Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment*. Neuroscience, 2001. **106**(3): p. 589-601.
54. Vila, M., D. Ramonet, and C. Perier, *Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues*. J Neurochem, 2008. **107**(2): p. 317-28.
55. Ungerstedt, U., *6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons*. Eur J Pharmacol, 1968. **5**(1): p. 107-10.
56. Luthman, J., et al., *Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage*. Behav Brain Res, 1989. **33**(3): p. 267-77.
57. Soto-Otero, R., et al., *Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease*. J Neurochem, 2000. **74**(4): p. 1605-12.
58. Deumens, R., A. Blokland, and J. Prickaerts, *Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway*. Exp Neurol, 2002. **175**(2): p. 303-17.
59. Truong, L., et al., *Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions*. Behav Brain Res, 2006. **169**(1): p. 1-9.
60. Ungerstedt, U., *Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system*. Acta Physiol Scand Suppl, 1971. **367**: p. 95-122.
61. Bourn, W.M., L. Chin, and A.L. Picchioni, *Enhancement of audiogenic seizure by 6-hydroxydopamine*. J Pharm Pharmacol, 1972. **24**(11): p. 913-4.
62. Przedborski, S., et al., *Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine*. Neuroscience, 1995. **67**(3): p. 631-47.
63. Marti, M.J., et al., *Striatal 6-hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat*. Brain Res, 2002. **958**(1): p. 185-91.
64. Jeon, B.S., V. Jackson-Lewis, and R.E. Burke, *6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death*. Neurodegeneration, 1995. **4**(2): p. 131-7.
65. Sun, W., et al., *Different striatal D2-like receptor function in an early stage after unilateral striatal lesion and medial forebrain bundle lesion in rats*. Brain Res, 2010. **1317**: p. 227-35.

66. Da Cunha, C., et al., *Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission*. Behav Brain Res, 2008. **189**(2): p. 364-72.
67. Hu, X., et al., *Peroxiredoxin-2 protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration via attenuation of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) signaling cascade*. J Neurosci, 2011. **31**(1): p. 247-61.
68. Bove, J., et al., *Adenosine A2A antagonism reverses levodopa-induced motor alterations in hemiparkinsonian rats*. Synapse, 2002. **46**(4): p. 251-7.
69. Rylander, D., et al., *A mGluR5 antagonist under clinical development improves L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats and monkeys*. Neurobiol Dis, 2010. **39**(3): p. 352-61.
70. Blandini, F., M.T. Armentero, and E. Martignoni, *The 6-hydroxydopamine model: news from the past*. Parkinsonism Relat Disord, 2008. **14 Suppl 2**: p. S124-9.
71. Branchi, I., et al., *Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model*. J Neurosci Res, 2008. **86**(9): p. 2050-61.
72. Rane, P., et al., *The histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, alleviates cognitive deficits in pre-motor stage PD*. Neuropharmacology, 2012. **62**(7): p. 2409-12.
73. Tadaiesky, M.T., et al., *Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease*. Neuroscience, 2008. **156**(4): p. 830-40.
74. Santiago, R.M., et al., *Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010. **34**(6): p. 1104-14.
75. Chaudhuri, K.R. and A.H. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment*. Lancet Neurol, 2009. **8**(5): p. 464-74.
76. Rodriguez-Oroz, M.C., et al., *Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms*. Lancet Neurol, 2009. **8**(12): p. 1128-39.
77. Maetzler, W., I. Liepelt, and D. Berg, *Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers*. Lancet Neurol, 2009. **8**(12): p. 1158-71.
78. Saper, C.B., T.C. Chou, and T.E. Scammell, *The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness*. Trends Neurosci, 2001. **24**(12): p. 726-31.
79. Shouse, M.N. and J.M. Siegel, *Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep*. Brain Res, 1992. **571**(1): p. 50-63.
80. Postuma, R.B., et al., *How does parkinsonism start? Prodromal parkinsonism motor changes in idiopathic REM sleep behaviour disorder*. Brain, 2012. **135**(Pt 6): p. 1860-70.
81. Chaudhuri, K.R., *Autonomic dysfunction in movement disorders*. Curr Opin Neurol, 2001. **14**(4): p. 505-11.
82. Pfeiffer, R.F., *Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2003. **2**(2): p. 107-16.
83. Siderowf, A., et al., *Impaired olfaction and other prodromal features in the Parkinson At-Risk Syndrome Study*. Mov Disord, 2012. **27**(3): p. 406-12.
84. Doty, R.L., *Olfaction in Parkinson's disease and related disorders*. Neurobiol Dis, 2012. **46**(3): p. 527-52.
85. Bohnen, N.I., et al., *Olfactory dysfunction, central cholinergic integrity and cognitive impairment in Parkinson's disease*. Brain, 2010. **133**(Pt 6): p. 1747-54.

86. Burn, D.J., *Beyond the iron mask: towards better recognition and treatment of depression associated with Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2002. **17**(3): p. 445-54.
87. Tolosa, E., Y. Compta, and C. Gaig, *The premotor phase of Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2007. **13 Suppl**: p. S2-7.
88. Aarsland, D., L. Marsh, and A. Schrag, *Neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2009. **24**(15): p. 2175-86.
89. Reijnders, J.S., et al., *A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2008. **23**(2): p. 183-9; quiz 313.
90. Weisskopf, M.G., et al., *Prospective study of phobic anxiety and risk of Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2003. **18**(6): p. 646-51.
91. Pluck, G.C. and R.G. Brown, *Apathy in Parkinson's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002. **73**(6): p. 636-42.
92. Kirsch-Darrow, L., et al., *Dissociating apathy and depression in Parkinson disease*. *Neurology*, 2006. **67**(1): p. 33-8.
93. Starkstein, S.E., *Apathy in Parkinson's disease: diagnostic and etiological dilemmas*. *Mov Disord*, 2012. **27**(2): p. 174-8.
94. Martinez-Horta, S., et al., *Apathy in Parkinson's disease: more than just executive dysfunction*. *J Int Neuropsychol Soc*, 2013. **19**(5): p. 571-82.
95. Brown, R.G. and G. Pluck, *Negative symptoms: the 'pathology' of motivation and goal-directed behaviour*. *Trends Neurosci*, 2000. **23**(9): p. 412-7.
96. Svenningsson, P., et al., *Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnosis, biomarkers, and treatment*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(8): p. 697-707.
97. Dubois, B. and B. Pillon, *Cognitive deficits in Parkinson's disease*. *J Neurol*, 1997. **244**(1): p. 2-8.
98. Muslimovic, D., et al., *Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease*. *Neurology*, 2005. **65**(8): p. 1239-45.
99. Bosboom, J.L., D. Stoffers, and E. Wolters, *Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease*. *J Neural Transm*, 2004. **111**(10-11): p. 1303-15.
100. Hely, M.A., et al., *The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years*. *Mov Disord*, 2008. **23**(6): p. 837-44.
101. Aarsland, D., et al., *Cognitive impairment in incident, untreated Parkinson disease: the Norwegian ParkWest study*. *Neurology*, 2009. **72**(13): p. 1121-6.
102. Litvan, I., et al., *MDS Task Force on mild cognitive impairment in Parkinson's disease: critical review of PD-MCI*. *Mov Disord*, 2011. **26**(10): p. 1814-24.
103. Janvin, C.C., et al., *Subtypes of mild cognitive impairment in Parkinson's disease: progression to dementia*. *Mov Disord*, 2006. **21**(9): p. 1343-9.
104. Pedersen, K.F., et al., *Occurrence and risk factors for apathy in Parkinson disease: a 4-year prospective longitudinal study*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2009. **80**(11): p. 1279-82.
105. Aarsland, D., J. Zaccai, and C. Brayne, *A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2005. **20**(10): p. 1255-63.
106. Seto-Salvia, N., et al., *Glucocerebrosidase mutations confer a greater risk of dementia during Parkinson's disease course*. *Mov Disord*, 2012. **27**(3): p. 393-9.
107. Petersen, R.C., et al., *Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome*. *Arch Neurol*, 1999. **56**(3): p. 303-8.
108. Petersen, R.C., et al., *Aging, memory, and mild cognitive impairment*. *Int Psychogeriatr*, 1997. **9 Suppl 1**: p. 65-9.
109. Dubois, B., *Is PD-MCI a useful concept?* *Mov Disord*, 2007. **22**(9): p. 1215-6.
110. Martinez-Horta, S. and J. Kulisevsky, *Is all cognitive impairment in Parkinson's disease "mild cognitive impairment"?* *J Neural Transm*, 2011. **118**(8): p. 1185-90.

111. Litvan, I., et al., *Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines*. *Mov Disord*, 2012. **27**(3): p. 349-56.
112. Pagonabarraga, J. and J. Kulisevsky, *Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease*. *Neurobiol Dis*, 2012. **46**(3): p. 590-6.
113. Dujardin, K., et al., *The spectrum of cognitive disorders in Parkinson's disease: A data-driven approach*. *Mov Disord*, 2013. **28**(2): p. 183-9.
114. Goldman, J.G. and I. Litvan, *Mild cognitive impairment in Parkinson's disease*. *Minerva Med*, 2011. **102**(6): p. 441-59.
115. Caviness, J.N., et al., *Defining mild cognitive impairment in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2007. **22**(9): p. 1272-7.
116. Zgaljardic, D.J., et al., *A review of the cognitive and behavioral sequelae of Parkinson's disease: relationship to frontostriatal circuitry*. *Cogn Behav Neurol*, 2003. **16**(4): p. 193-210.
117. Calabresi, P., et al., *Neuronal networks and synaptic plasticity in Parkinson's disease: beyond motor deficits*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2007. **13 Suppl 3**: p. S259-62.
118. Emre, M., *Dementia associated with Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2003. **2**(4): p. 229-37.
119. Weintraub, D., et al., *Evidence for impaired encoding and retrieval memory profiles in Parkinson disease*. *Cogn Behav Neurol*, 2004. **17**(4): p. 195-200.
120. Bronnick, K., et al., *Verbal memory in drug-naive, newly diagnosed Parkinson's disease. The retrieval deficit hypothesis revisited*. *Neuropsychology*, 2011. **25**(1): p. 114-24.
121. Siegert, R.J., et al., *A meta-analysis of performance on simple span and more complex working memory tasks in Parkinson's disease*. *Neuropsychology*, 2008. **22**(4): p. 450-61.
122. Foltynie, T., et al., *The cognitive ability of an incident cohort of Parkinson's patients in the UK. The CamPaIGN study*. *Brain*, 2004. **127**(Pt 3): p. 550-60.
123. Williams-Gray, C.H., et al., *Evolution of cognitive dysfunction in an incident Parkinson's disease cohort*. *Brain*, 2007. **130**(Pt 7): p. 1787-98.
124. Rogers, R.D., et al., *Dissociating executive mechanisms of task control following frontal lobe damage and Parkinson's disease*. *Brain*, 1998. **121 (Pt 5)**: p. 815-42.
125. Owen, A.M., et al., *Contrasting mechanisms of impaired attentional set-shifting in patients with frontal lobe damage or Parkinson's disease*. *Brain*, 1993. **116 (Pt 5)**: p. 1159-75.
126. Kehagia, A.A., R.A. Barker, and T.W. Robbins, *Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(12): p. 1200-13.
127. Kulisevsky, J., *Role of dopamine in learning and memory: implications for the treatment of cognitive dysfunction in patients with Parkinson's disease*. *Drugs Aging*, 2000. **16**(5): p. 365-79.
128. Williams-Gray, C.H., et al., *The distinct cognitive syndromes of Parkinson's disease: 5 year follow-up of the CamPaIGN cohort*. *Brain*, 2009. **132**(Pt 11): p. 2958-69.
129. McKinlay, A., et al., *Characteristics of executive function impairment in Parkinson's disease patients without dementia*. *J Int Neuropsychol Soc*, 2010. **16**(2): p. 268-77.
130. Growdon, J.H., S. Corkin, and T.J. Rosen, *Distinctive aspects of cognitive dysfunction in Parkinson's disease*. *Adv Neurol*, 1990. **53**: p. 365-76.
131. Kulisevsky, J., et al., *Acute effects of levodopa on neuropsychological performance in stable and fluctuating Parkinson's disease patients at different levodopa plasma levels*. *Brain*, 1996. **119 (Pt 6)**: p. 2121-32.

132. Kudlicka, A., L. Clare, and J.V. Hindle, *Executive functions in Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis*. *Mov Disord*, 2011. **26**(13): p. 2305-15.
133. Owen, A.M., et al., *Fronto-striatal cognitive deficits at different stages of Parkinson's disease*. *Brain*, 1992. **115 (Pt 6)**: p. 1727-51.
134. Brown, R.G. and C.D. Marsden, *Internal versus external cues and the control of attention in Parkinson's disease*. *Brain*, 1988. **111 (Pt 2)**: p. 323-45.
135. Lewis, S.J., et al., *Dopaminergic basis for deficits in working memory but not attentional set-shifting in Parkinson's disease*. *Neuropsychologia*, 2005. **43**(6): p. 823-32.
136. Vendrell, P., et al., *The role of prefrontal regions in the Stroop task*. *Neuropsychologia*, 1995. **33**(3): p. 341-52.
137. Monchi, O., et al., *Neural bases of set-shifting deficits in Parkinson's disease*. *J Neurosci*, 2004. **24**(3): p. 702-10.
138. Peterson, B.S., et al., *An fMRI study of Stroop word-color interference: evidence for cingulate subregions subserving multiple distributed attentional systems*. *Biol Psychiatry*, 1999. **45**(10): p. 1237-58.
139. Pihlajamaki, M., et al., *Verbal fluency activates the left medial temporal lobe: a functional magnetic resonance imaging study*. *Ann Neurol*, 2000. **47**(4): p. 470-6.
140. Stern, Y., et al., *Comparison of cognitive changes in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease*. *Arch Neurol*, 1993. **50**(10): p. 1040-5.
141. Pillon, B., et al., *Explicit memory in Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases*. *Arch Neurol*, 1993. **50**(4): p. 374-9.
142. Whittington, C.J., J. Podd, and M.M. Kan, *Recognition memory impairment in Parkinson's disease: power and meta-analyses*. *Neuropsychology*, 2000. **14**(2): p. 233-46.
143. Muslimovic, D., et al., *Motor procedural learning in Parkinson's disease*. *Brain*, 2007. **130**(Pt 11): p. 2887-97.
144. Pereira, J.B., et al., *Neuroanatomical substrate of visuospatial and visuoperceptual impairment in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2009. **24**(8): p. 1193-9.
145. Pillon, B., et al., *Memory for spatial location is affected in Parkinson's disease*. *Neuropsychologia*, 1996. **34**(1): p. 77-85.
146. Goldman, W.P., et al., *Cognitive and motor functioning in Parkinson disease: subjects with and without questionable dementia*. *Arch Neurol*, 1998. **55**(5): p. 674-80.
147. Scatton, B., et al., *Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease*. *Brain Res*, 1983. **275**(2): p. 321-8.
148. Cummings, J.L., *Frontal-subcortical circuits and human behavior*. *Arch Neurol*, 1993. **50**(8): p. 873-80.
149. Calabresi, P., et al., *A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance*. *Lancet Neurol*, 2006. **5**(11): p. 974-83.
150. Lewis, S.J., et al., *Using executive heterogeneity to explore the nature of working memory deficits in Parkinson's disease*. *Neuropsychologia*, 2003. **41**(6): p. 645-54.
151. Monchi, O., et al., *Cortical activity in Parkinson's disease during executive processing depends on striatal involvement*. *Brain*, 2007. **130**(Pt 1): p. 233-44.
152. Lewis, S.J., et al., *Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry*. *J Neurosci*, 2003. **23**(15): p. 6351-6.
153. Floresco, S.B. and O. Magyar, *Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006. **188**(4): p. 567-85.

154. Jay, T.M., *Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms*. Prog Neurobiol, 2003. **69**(6): p. 375-90.
155. Lidow, M.S., P.O. Koh, and A.F. Arnsten, *D1 dopamine receptors in the mouse prefrontal cortex: Immunocytochemical and cognitive neuropharmacological analyses*. Synapse, 2003. **47**(2): p. 101-8.
156. Xu, Y., et al., *Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. Prog Neurobiol, 2012. **97**(1): p. 1-13.
157. Seamans, J.K. and C.R. Yang, *The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex*. Prog Neurobiol, 2004. **74**(1): p. 1-58.
158. Sawaguchi, T., *The role of D1-dopamine receptors in working memory-guided movements mediated by frontal cortical areas*. Parkinsonism Relat Disord, 2000. **7**(1): p. 9-19.
159. Costa, A., et al., *Dopamine and cognitive functioning in de novo subjects with Parkinson's disease: effects of pramipexole and pergolide on working memory*. Neuropsychologia, 2009. **47**(5): p. 1374-81.
160. Floresco, S.B., et al., *Multiple dopamine receptor subtypes in the medial prefrontal cortex of the rat regulate set-shifting*. Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(2): p. 297-309.
161. Bohnen, N.I., et al., *Cortical cholinergic function is more severely affected in parkinsonian dementia than in Alzheimer disease: an in vivo positron emission tomographic study*. Arch Neurol, 2003. **60**(12): p. 1745-8.
162. Bohnen, N.I. and R.L. Albin, *The cholinergic system and Parkinson disease*. Behav Brain Res, 2011. **221**(2): p. 564-73.
163. Bohnen, N.I., et al., *Cognitive correlates of cortical cholinergic denervation in Parkinson's disease and parkinsonian dementia*. J Neurol, 2006. **253**(2): p. 242-7.
164. Cools, R., *Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease*. Neurosci Biobehav Rev, 2006. **30**(1): p. 1-23.
165. Poewe, W., et al., *High-speed memory scanning in Parkinson's disease: adverse effects of levodopa*. Ann Neurol, 1991. **29**(6): p. 670-3.
166. Mollion, H., et al., *Dissociable effects of dopaminergic therapy on spatial versus non-spatial working memory in Parkinson's disease*. Neuropsychologia, 2003. **41**(11): p. 1442-51.
167. Cooper, J.A., et al., *Different effects of dopaminergic and anticholinergic therapies on cognitive and motor function in Parkinson's disease. A follow-up study of untreated patients*. Brain, 1992. **115 (Pt 6)**: p. 1701-25.
168. Gotham, A.M., R.G. Brown, and C.D. Marsden, *'Frontal' cognitive function in patients with Parkinson's disease 'on' and 'off' levodopa*. Brain, 1988. **111 (Pt 2)**: p. 299-321.
169. Kulisevsky, J., et al., *Chronic effects of dopaminergic replacement on cognitive function in Parkinson's disease: a two-year follow-up study of previously untreated patients*. Mov Disord, 2000. **15**(4): p. 613-26.
170. Lange, K.W., et al., *L-dopa withdrawal in Parkinson's disease selectively impairs cognitive performance in tests sensitive to frontal lobe dysfunction*. Psychopharmacology (Berl), 1992. **107**(2-3): p. 394-404.
171. Pillon, B., et al., *Cognitive slowing in Parkinson's disease fails to respond to levodopa treatment: the 15-objects test*. Neurology, 1989. **39**(6): p. 762-8.
172. Pillon, B., et al., *Does cognitive impairment in Parkinson's disease result from non-dopaminergic lesions?* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1989. **52**(2): p. 201-6.
173. Halliday, G.M. and H. McCann, *The progression of pathology in Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1184**: p. 188-95.

174. Cools, R., et al., *L-DOPA disrupts activity in the nucleus accumbens during reversal learning in Parkinson's disease*. *Neuropsychopharmacology*, 2007. **32**(1): p. 180-9.
175. Cools, R., et al., *Dopaminergic modulation of high-level cognition in Parkinson's disease: the role of the prefrontal cortex revealed by PET*. *Brain*, 2002. **125**(Pt 3): p. 584-94.
176. Clarke, C.E., *Neuroprotection and pharmacotherapy for motor symptoms in Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2004. **3**(8): p. 466-74.
177. Dubois, B., et al., *Cholinergic deficiency and frontal dysfunction in Parkinson's disease*. *Ann Neurol*, 1990. **28**(2): p. 117-21.
178. Aarsland, D., et al., *Donepezil for cognitive impairment in Parkinson's disease: a randomised controlled study*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002. **72**(6): p. 708-12.
179. Emre, M., et al., *Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(24): p. 2509-18.
180. Aarsland, D., M. Hutchinson, and J.P. Larsen, *Cognitive, psychiatric and motor response to galantamine in Parkinson's disease with dementia*. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2003. **18**(10): p. 937-41.
181. McDowell, K. and M.F. Chesselet, *Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease*. *Neurobiol Dis*, 2012. **46**(3): p. 597-606.
182. Magen, I. and M.F. Chesselet, *Genetic mouse models of Parkinson's disease The state of the art*. *Prog Brain Res*, 2010. **184**: p. 53-87.
183. Lindgren, H.S. and S.B. Dunnett, *Cognitive dysfunction and depression in Parkinson's disease: what can be learned from rodent models?* *Eur J Neurosci*, 2012. **35**(12): p. 1894-907.
184. Olton, D.S., *The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology*. *Physiol Behav*, 1987. **40**(6): p. 793-7.
185. Morris, R., *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat*. *J Neurosci Methods*, 1984. **11**(1): p. 47-60.
186. Birrell, J.M. and V.J. Brown, *Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat*. *J Neurosci*, 2000. **20**(11): p. 4320-4.
187. Carli, M., et al., *Effects of lesions to ascending noradrenergic neurones on performance of a 5-choice serial reaction task in rats; implications for theories of dorsal noradrenergic bundle function based on selective attention and arousal*. *Behav Brain Res*, 1983. **9**(3): p. 361-80.
188. Dunnett, S.B., A. Meldrum, and J.L. Muir, *Frontal-striatal disconnection disrupts cognitive performance of the frontal-type in the rat*. *Neuroscience*, 2005. **135**(4): p. 1055-65.
189. Da Cunha, C., et al., *Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system*. *Neurobiol Learn Mem*, 2003. **79**(3): p. 236-42.
190. Morris, R.G., et al., *Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions*. *Nature*, 1982. **297**(5868): p. 681-3.
191. D'Hooge, R. and P.P. De Deyn, *Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001. **36**(1): p. 60-90.
192. Brown, V.J. and E.M. Bowman, *Rodent models of prefrontal cortical function*. *Trends Neurosci*, 2002. **25**(7): p. 340-3.
193. Ng, C.W., et al., *Double dissociation of attentional resources: prefrontal versus cingulate cortices*. *J Neurosci*, 2007. **27**(45): p. 12123-31.
194. O'Neill, M. and V.J. Brown, *The effect of striatal dopamine depletion and the adenosine A2A antagonist KW-6002 on reversal learning in rats*. *Neurobiol Learn Mem*, 2007. **88**(1): p. 75-81.
195. McAlonan, K. and V.J. Brown, *Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat*. *Behav Brain Res*, 2003. **146**(1-2): p. 97-103.

196. Chudasama, Y. and T.W. Robbins, *Functions of frontostriatal systems in cognition: comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans*. Biol Psychol, 2006. **73**(1): p. 19-38.
197. Carli, M., G.H. Jones, and T.W. Robbins, *Effects of unilateral dorsal and ventral striatal dopamine depletion on visual neglect in the rat: a neural and behavioural analysis*. Neuroscience, 1989. **29**(2): p. 309-27.
198. Robbins, T.W., *The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry*. Psychopharmacology (Berl), 2002. **163**(3-4): p. 362-80.
199. Sanchez-Roige, S., Y. Pena-Oliver, and D.N. Stephens, *Measuring impulsivity in mice: the five-choice serial reaction time task*. Psychopharmacology (Berl), 2012. **219**(2): p. 253-70.
200. Watson, D.J., et al., *Selective blockade of dopamine D3 receptors enhances while D2 receptor antagonism impairs social novelty discrimination and novel object recognition in rats: a key role for the prefrontal cortex*. Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(3): p. 770-86.
201. Fernandes, V.S., et al., *Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(6): p. 1479-83.
202. Fanselow, M.S. and A.M. Poulos, *The neuroscience of mammalian associative learning*. Annu Rev Psychol, 2005. **56**: p. 207-34.
203. LeDoux, J.E., *Emotion circuits in the brain*. Annu Rev Neurosci, 2000. **23**: p. 155-84.
204. Castro, A.A., et al., *Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease*. Behav Brain Res, 2012. **229**(1): p. 208-15.
205. Petruilis, A., P. Alvarez, and H. Eichenbaum, *Neural correlates of social odor recognition and the representation of individual distinctive social odors within entorhinal cortex and ventral subiculum*. Neuroscience, 2005. **130**(1): p. 259-74.
206. Kogan, J.H., P.W. Frankland, and A.J. Silva, *Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice*. Hippocampus, 2000. **10**(1): p. 47-56.
207. Zhu, X.R., et al., *Non-motor behavioural impairments in parkin-deficient mice*. Eur J Neurosci, 2007. **26**(7): p. 1902-11.
208. Pham, T.T., et al., *DJ-1-deficient mice show less TH-positive neurons in the ventral tegmental area and exhibit non-motoric behavioural impairments*. Genes Brain Behav, 2010. **9**(3): p. 305-17.
209. Li, X., et al., *Cognitive Dysfunction Precedes the Onset of Motor Symptoms in the MitoPark Mouse Model of Parkinson's Disease*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71341.
210. Ekstrand, M.I., et al., *Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(9): p. 935-44.
211. Ekstrand, M.I., et al., *Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1325-30.
212. Vuckovic, M.G., et al., *Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury*. Neurobiol Dis, 2008. **32**(2): p. 319-27.
213. Deguil, J., et al., *Neuroprotective effect of PACAP on translational control alteration and cognitive decline in MPTP parkinsonian mice*. Neurotox Res, 2010. **17**(2): p. 142-55.

214. Ferro, M.M., et al., *Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations*. J Neurosci Methods, 2005. **148**(1): p. 78-87.
215. Levin, E.D., P.J. Bushnell, and A.H. Rezvani, *Attention-modulating effects of cognitive enhancers*. Pharmacol Biochem Behav, 2011. **99**(2): p. 146-54.
216. Braga, R., et al., *Lesion of the substantia nigra, pars compacta impairs delayed alternation in a Y-maze in rats*. Exp Neurol, 2005. **192**(1): p. 134-41.
217. Dowd, E. and S.B. Dunnett, *Deficits in a lateralized associative learning task in dopamine-depleted rats with functional recovery by dopamine-rich transplants*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(7): p. 1953-9.
218. Perez, V., et al., *Effect of the additional noradrenergic neurodegeneration to 6-OHDA-lesioned rats in levodopa-induced dyskinesias and in cognitive disturbances*. J Neural Transm, 2009. **116**(10): p. 1257-66.
219. Eskow Jaunarajs, K.L., et al., *Behavioral and neurochemical effects of chronic L-DOPA treatment on nonmotor sequelae in the hemiparkinsonian rat*. Behav Pharmacol, 2010. **21**(7): p. 627-37.
220. Carli, M., J.L. Evenden, and T.W. Robbins, *Depletion of unilateral striatal dopamine impairs initiation of contralateral actions and not sensory attention*. Nature, 1985. **313**(6004): p. 679-82.
221. Darbaky, Y., et al., *High frequency stimulation of the subthalamic nucleus has beneficial antiparkinsonian effects on motor functions in rats, but less efficiency in a choice reaction time task*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(4): p. 951-6.
222. Zigmond, M.J., et al., *Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications*. Trends Neurosci, 1990. **13**(7): p. 290-6.
223. Baunez, C. and T.W. Robbins, *Effects of dopamine depletion of the dorsal striatum and further interaction with subthalamic nucleus lesions in an attentional task in the rat*. Neuroscience, 1999. **92**(4): p. 1343-56.
224. Paxinos, G. and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press Inc., New York, 1982.
225. Casas, M., et al., *Scopolamine prevents tolerance to the effects of caffeine on rotational behavior in 6-hydroxydopamine-denervated rats*. Eur J Pharmacol, 1999. **366**(1): p. 1-11.
226. Perez, V., et al., *Noradrenergic modulation of the motor response induced by long-term levodopa administration in Parkinsonian rats*. J Neural Transm, 2009. **116**(7): p. 867-74.
227. Papa, S.M., et al., *Motor fluctuations in levodopa treated parkinsonian rats: relation to lesion extent and treatment duration*. Brain Res, 1994. **662**(1-2): p. 69-74.
228. Ennaceur, A. and J. Delacour, *A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data*. Behav Brain Res, 1988. **31**(1): p. 47-59.
229. Jenkins, T.A., et al., *Tryptophan depletion impairs object-recognition memory in the rat: reversal by risperidone*. Behav Brain Res, 2010. **208**(2): p. 479-83.
230. Wang, S.H., et al., *Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression*. J Psychopharmacol, 2009. **23**(3): p. 295-304.
231. Yang, M. and J.N. Crawley, *Simple behavioral assessment of mouse olfaction*. Curr Protoc Neurosci, 2009. **Chapter 8**: p. Unit 8 24.
232. Dawson, P.A., S.E. Steane, and D. Markovich, *Impaired memory and olfactory performance in NaSi-1 sulphate transporter deficient mice*. Behav Brain Res, 2005. **159**(1): p. 15-20.
233. Luo, A.H., et al., *Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o)*. Brain Res, 2002. **941**(1-2): p. 62-71.

234. Cenci, M.A., C.S. Lee, and A. Bjorklund, *L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(8): p. 2694-706.
235. Lindgren, H.S., et al., *The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration*. Behav Brain Res, 2007. **177**(1): p. 150-9.
236. Plouffe, B. and M. Tiberi, *Functional analysis of human D1 and D5 dopaminergic G protein-coupled receptors: lessons from mutagenesis of a conserved serine residue in the cytosolic end of transmembrane region 6*. Methods Mol Biol, 2013. **964**: p. 141-80.
237. Mayeux, R., *The "serotonin hypothesis" for depression in Parkinson's disease*. Adv Neurol, 1990. **53**: p. 163-6.
238. Dalley, J.W., R.N. Cardinal, and T.W. Robbins, *Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates*. Neurosci Biobehav Rev, 2004. **28**(7): p. 771-84.
239. Cools, R., et al., *Mechanisms of cognitive set flexibility in Parkinson's disease*. Brain, 2001. **124**(Pt 12): p. 2503-12.
240. Denenberg, V.H., D.S. Kim, and R.D. Palmiter, *The role of dopamine in learning, memory, and performance of a water escape task*. Behav Brain Res, 2004. **148**(1-2): p. 73-8.
241. Holscher, C., *Time, space and hippocampal functions*. Rev Neurosci, 2003. **14**(3): p. 253-84.
242. Olton, D.S., J.A. Walker, and F.H. Gage, *Hippocampal connections and spatial discrimination*. Brain Res, 1978. **139**(2): p. 295-308.
243. Suzuki, K., et al., *Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9260.
244. Sossi, V., et al., *Dopamine transporter relation to dopamine turnover in Parkinson's disease: a positron emission tomography study*. Ann Neurol, 2007. **62**(5): p. 468-74.

ANEXO I:

Artículo

“Modulation of the motor response to dopaminergic drugs in a parkinsonian model of combined dopaminergic and noradrenergic degeneration”

Por Perez V, **Sosti V**, Rubio A, Barbanoj M, Rodríguez-Alvarez J, Kulisevsky J.

Eur J Pharmacol, 2007. **576**(1-3): p. 83-90



Modulation of the motor response to dopaminergic drugs in a parkinsonian model of combined dopaminergic and noradrenergic degeneration

Virgili Pérez^a, Victoria Sosti^a, Antonia Rubio^a, Manel Barbanj^a,
José Rodríguez-Álvarez^b, Jaime Kulisevsky^{a,c,*}

^a *Laboratori de Neuropsicofarmacologia, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau, Avgda. St. Antoni M^a Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain*

^b *Institut de Neurociències and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat Autònoma de Barcelona, Campus UAB, 08193 Bellaterra, Spain*

^c *Servei de Neurologia and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Avgda. St. Antoni M^a Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain*

Received 1 February 2007; received in revised form 10 August 2007; accepted 21 August 2007
Available online 25 August 2007

Abstract

Besides dopaminergic deficiency, other neurotransmitter systems such as noradrenergic nuclei are affected in Parkinson's disease. *Locus coeruleus* degeneration might influence the response to dopamine replacement and the presence of long-term complications such as dyskinesias. In this scenario of noradrenergic and dopaminergic neurodegeneration, behavioural effects induced by dopaminergic-interacting drugs are incompletely known. We investigated whether noradrenergic lesion modulates the levodopa (L-DOPA) response and modifies the response to adenosine antagonists and its interaction with L-DOPA. We examined the motor behaviour induced by: 1) subthreshold doses of L-DOPA (2mg/kg, i.p.), 2) the adenosine-receptor antagonist caffeine (10mg/kg), and 3) the combination of L-DOPA (2mg/kg) and caffeine (10mg/kg). Each study was done in two experimental conditions: a) rats with unilateral 6-OHDA lesion and b) rats with a lesion of the nigrostriatal pathway (6-OHDA) combined with selective denervation of *locus coeruleus*-noradrenergic terminal fields by *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4). While only 28% of the 6-OHDA-lesioned animals presented circling behaviour after L-DOPA challenge, all (100%) double-denervated animals rotated after the same L-DOPA dose ($p < 0.05$). No statistical differences in the percentage of rotating animals were observed between single- and double-denervated rats after caffeine challenge. Combined L-DOPA–caffeine challenge produced rotational behaviour in all (100%) single- and double-denervated rats. No differences in total turns were observed between single- and double-denervated animals in each treatment condition. These findings suggest that additional noradrenergic denervation selectively decreases the motor threshold to L-DOPA treatment without modifying the magnitude or the pattern of the motor response to adenosinergic antagonism.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Parkinsonism model; 6-Hydroxydopamine; DSP-4; Noradrenergic depletion; Turning behaviour; L-DOPA; Adenosine antagonist

1. Introduction

While widespread dopaminergic deficiency is the main biochemical feature of Parkinson's disease, other neurotransmitter systems such as the brainstem noradrenergic nuclei are also altered in the degenerative process (Hornykiewicz and Kish, 1987). It has been suggested that progressive neurodegeneration of the main noradrenergic nucleus – the *locus coeruleus* – might influence not only the progression of

Parkinson's disease but also the response to dopaminergic replacement (Cotzias et al., 1967). Furthermore, an additional noradrenaline deficit might be relevant for the pathogenesis of long-term complications of L-DOPA treatment such as the wearing-off phenomenon and dyskinesias (Bezard et al., 2001; Obeso et al., 2000; Marsden and Parkes, 1976). It has been shown that the integrity of the *locus coeruleus* contributes to neuroprotection of dopaminergic neurons against dopaminergic toxicity (Fornai et al., 1995, 1997, 1998, 1999; Marien et al., 1993; Mavridis et al., 1991a,b; Srinivasan and Schmidt, 2003), and that noradrenergic drugs, such as the adrenergic α_2 -receptor antagonist idazoxan, protect against the dopaminergic

* Corresponding author. Tel.: +34 93 291 9000x2158; fax: +34 93 291 9178.
E-mail address: jkulisevsky@santpau.es (J. Kulisevsky).

neurodegeneration induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Srinivasan and Schmidt, 2004). In the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease (Ungerstedt, 1971), adrenergic α_2 -receptor antagonists have been shown to increase spontaneous locomotion (Henry et al., 1998) as well as the rotational behaviour induced by direct and indirect stimulators of dopaminergic neurotransmission such as amphetamine (Mavridis et al., 1991b), L-DOPA, apomorphine (Chopin et al., 1999; Haapalinna et al., 2003; Srinivasan and Schmidt, 2005) or dopamine-uptake inhibitors (Lane et al., 2005). Moreover, adrenergic α_2 -receptor antagonists have the potential to reduce dyskinesias in monkeys with experimental parkinsonism (Fox et al., 2001; Grondin et al., 2000; Savola et al., 2003) and in humans with Parkinson's disease (Rascol et al., 2001).

Both in the MPTP-mouse model and in the 6-OHDA rat model of parkinsonism, additional *locus coeruleus* degeneration with the selective noradrenergic neurotoxin *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) has been observed to increase parkinsonism (Archer and Fredriksson, 2006; Nishi et al., 1991; Srinivasan and Schmidt, 2003). Nevertheless, the behavioural effects of dopaminergic drugs in animal models of Parkinson's disease with additional lesions of the noradrenergic neurons are incompletely known and somehow contradictory, with motor response to L-DOPA decreased in MPTP-mice (Nishi et al., 1991) and increased in 6-OHDA-lesioned rats (Srinivasan and Schmidt, 2003). Less is known about the effects of the additional noradrenergic lesion on the motor response to other neurotransmitters that can interact with the striatal dopaminergic activity. It is well known that adenosinergic antagonists can directly stimulate the dopaminergic responses by means of the adenosine/dopamine A_1/D_1 and A_{2A}/D_2 heteromeric receptor complexes (Ferre et al., 1996; Hillion et al., 2002) regulating the activity of the basal ganglia on the motor behaviour (Ferre et al., 1997; Svenningsson et al., 1999). Thus, blockade of adenosinergic receptors potentiates the turning behaviour induced by dopaminergic agonists in the 6-OHDA animal model of parkinsonism (Casas et al., 2000; Fuxe and Ungerstedt, 1974;) and has antiparkinsonian-like effects (Fenu et al., 1997; Kanda et al., 2000; Koga et al., 2000) which have stimulated the therapeutic use of adenosine A_{2A} -receptor antagonists in Parkinson's disease treatment (Morelli, 2003).

In the present study we evaluated whether an additional noradrenergic lesion modulates the threshold of the L-DOPA response on the turning behaviour of the 6-OHDA-lesioned rat model of parkinsonism, and whether it modifies the motor response to the adenosinergic drug caffeine and its interaction with L-DOPA.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Sprague–Dawley rats weighing 70–100g were obtained from Charles River (France) and housed three per cage under standard conditions of temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and a 12h light/dark cycle (lights on at 08:00h). Rats were allowed free access to commercial pellets and water. All experimental

procedures were conducted in compliance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) for care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimise the number of animals used and their suffering.

2.2. Unilateral 6-OHDA lesion of the medial forebrain bundle

To minimise the damage to noradrenergic neurons, 30min prior to surgery animals were injected intraperitoneally (i.p.) with the noradrenaline uptake inhibitor desipramine (25mg/kg, Sigma) dissolved in sterile 0.9% w/v sodium chloride and injected at a volume of 1ml/kg of body weight.

Under deep surgical anaesthesia (ketamine: 50mg/kg; xylazine: 5.3mg/kg), rats weighing $160 \pm 15\text{g}$ were placed in a David Kopf stereotaxic frame and given stereotaxic injections of 4 μl of 6-OHDA HCl (Sigma) at a concentration of 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of toxin, diluted in sterile water with 0.2% ascorbic acid (Sigma). Injections were placed into the left medial forebrain bundle (A: -4.4mm , L: -1.2mm , V: -7.8mm , from bregma) (Paxinos and Watson, 1982) using a Hamilton syringe at 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ infusion rate. Following each injection, the cannula was left in place for 2 additional min to avoid toxin reflux.

2.3. Rotational behaviour

Rotational behaviour was recorded using a computerised system (Panlab, S. A., Barcelona, Spain). Animals were allocated individually into plastic hemispherical bowls (40cm in diameter), attached to a harness and connected to photoelectric detectors. For the apomorphine test, rotational behaviour was monitored every 2min for 1h. When L-DOPA or caffeine was administered the rotational behaviour was recorded over 4h.

2.4. Animal selection

To select the successfully denervated animals, 21days post-surgery all rats were challenged with a small dose of apomorphine (0.05mg/kg s.c.) (Casas et al., 1999). The apomorphine test was repeated three times with an interval of 48h between treatments. Rats showing more than 100 contralateral half turns (180°) in 1h during the two last tests were used in the study. It has been previously demonstrated that rats meeting this criterion have a depletion of striatal dopamine of over 95% (Casas et al., 1999; Papa et al., 1994).

2.5. Noradrenergic lesion

Locus coeruleus-noradrenergic terminal fields were selectively denervated by DSP-4 (50mg/kg i.p., Sigma). DSP-4 was dissolved in saline and immediately administered to selected 6-OHDA-denervated rats following selection by apomorphine test.

2.6. Behavioural assessment

Seventy-two dopaminergic-denervated rats (previously selected by the apomorphine test) were randomly allocated to 8 different groups of 14 rats each. Four of these groups were lesioned with

the noradrenergic toxin DSP-4 (6-OHDA and 6-OHDA+DSP-4 groups).

Seven days after the noradrenergic lesion we tested the effect of caffeine, L-DOPA, or a combination of these two drugs on rotational behaviour by grouping each of the four 6-OHDA groups with a 6-OHDA+DSP-4 group and administering: 1) L-DOPA (2mg/kg) plus saline; 2) caffeine (10mg/kg) plus saline; 3) caffeine (10mg/kg) plus L-DOPA (2mg/kg); or 4) an injection of saline–saline, respectively. All rats had previously received the injection of benserazide (10mg/kg).

Contralateral motor activity was measured by counting the total number of net contralateral turns after subtracting the ipsilateral rotations (Bové et al., 2002).

Both the number of total turns and the pooled temporal pattern of rotation were analyzed in rats showing contralateral motor activity. For this purpose, we pooled the rotations recorded in each group in lapses of 20min after the first hour of treatment.

2.7. Drug treatment

Apomorphine HCL (Sigma, St. Louis, MO) was dissolved in physiological saline. The solution was prepared daily, protected from the light at all times to avoid oxidation and kept at 4°C when not in use. The dose of apomorphine was calculated as free base and injected subcutaneously (s.c.) in a volume of 1ml/kg of body weight.

Two weeks after the last apomorphine dose, rats were acutely injected with a dose of L-DOPA, caffeine, L-DOPA + caffeine or saline.

Caffeine (10mg/kg, Sigma) was dissolved in saline and injected subcutaneously (s.c.) in a volume of 1ml/kg.

Benserazide HCl (10mg/kg i.p., Sigma), a peripheral DOPA decarboxylase inhibitor was dissolved in sterile 0.9% w/v sodium chloride with 0.2% ascorbic acid solution and administered 30min before the drug administration. L-DOPA (2mg/kg i.p.) was suspended in sterile water with 10% cremophor EL© (Sigma).

2.8. Determination of catecholamines

To determine the dopaminergic neurodegeneration induced by 6-OHDA, we analysed the striatal levels of dopamine and its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in both hemispheres (Prats et al., 2000). The noradrenergic neurodegeneration induced by DSP-4 was evaluated analysing the hippocampal levels of noradrenaline (Srinivasan and Schmidt, 2003). Seven days after the injection of caffeine, L-DOPA, or a combination of the two, rats were killed by injection of ketamine (50mg/kg i.p.) and xylazine (5.3mg/kg i.p.) and decapitated. Brains were immediately removed from the skull and placed on ice-chilled Petri dishes. Brain structures, striatum and hippocampus of both hemispheres were dissected from the preparation and the tissues were immediately placed on dry ice and stored in a freezer at –70°C until analysis.

The concentrations of dopamine, DOPAC and HVA in striatum and noradrenaline in hippocampus (Srinivasan and

Schmidt, 2003) were analysed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to an electrochemical detector (Perez and Unzeta, 2003). Dopamine, DOPAC, HVA and noradrenaline external standards were obtained from Sigma©.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of rotational data was performed on mean differences in the treatment groups using analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* analysis. Yates' chi-square test method was used to compare proportions.

3. Results

3.1. Effect of striatal dopamine and hippocampal noradrenaline depletions induced by 6-OHDA and DSP-4 toxins

As shown in Table 1A, the striatal dopamine, DOPAC and HVA contents of the animals selected for this study were drastically reduced on the lesioned side as compared to the non-lesioned side (Prats et al., 2000; Srinivasan and Schmidt, 2003). DSP-4 toxicity was confirmed by the lack of detection of noradrenaline in the analysed hippocampus, as previously described by Srinivasan and Schmidt, 2003 (Table 1B).

3.2. Noradrenergic system integrity on L-DOPA rotational motor sensitivity

While none of the control rats (sham- and single DSP-4-lesioned groups) rotated after L-DOPA administration (data not shown), L-DOPA induced a contralateral rotation activity in only four of the dopamine-depleted rats (~28%). In contrast, L-DOPA induced the turning behaviour in 100% of the double-lesioned rats (6-OHDA+DSP-4) (Table 2).

Table 1

Effect of 6-OHDA or DSP-4 on dopamine levels in striatum or on noradrenaline levels in hippocampus of Sprague–Dawley rats

A. Dopaminergic lesion induced by 6-OHDA			
	DA	DOPAC	HVA
Non-denervated striatum	9487±1424	1755±373	762±232
Denervated striatum	ND	ND	ND
B. Noradrenergic lesion induced by DSP-4			
			NA
Non-denervated hippocampus			127±8
Denervated hippocampus			ND

Rats were lesioned unilaterally by microinjection of 6-OHDA into left striatum (6-OHDA-lesioned group) (A). Half of the animals received an injection of DSP-4 toxin (6-OHDA+DSP-4-lesioned group) (B). Animals were sacrificed by decapitation and the striata and hippocampus were dissected and homogenised. The corresponding supernatants were injected into HPLC for dopamine (DA), DOPAC and HVA striatal determination or noradrenaline (NA) determination in hippocampus. ND represents levels non-detected by electrochemical detection. The results are expressed in pg of DA, DOPAC, HVA or NA per mg of tissue as mean±S.D. of nine independent experiments in duplicate.

Table 2
Turning behaviour response in 6-OHDA- or 6-OHDA+DSP-4-lesioned rats

Treatment	6-OHDA group	6-OHDA+DSP-4 group
Saline	0	0
L-DOPA	4 ^(a)	14
Caffeine	6	5
L-DOPA+Caffeine	14	14

Values represent the number of lesioned rats that rotated after L-DOPA (2 mg/kg), caffeine (10 mg/kg) or L-DOPA+caffeine treatment ($n=14$ for each group).
^(a)Significantly different from the same treatment carried out in the 6-OHDA+DSP-4-lesioned group ($p=0.0004$, Yates' chi-square test).

3.3. Noradrenergic system integrity on caffeine rotational motor sensitivity

Contralateral turning induced by caffeine administration (10mg/kg) was observed in ~42% of single-lesioned (6-OHDA) rats. A non-significant number of animals (~36%) in the double-lesioned group (6-OHDA+DSP-4 group) rotated after caffeine administration (Table 2).

3.4. Noradrenergic system integrity on the rotational motor sensibility induced by L-DOPA and caffeine interaction

Caffeine and L-DOPA co-administration in the group of single-lesioned (6-OHDA) rats produced a significant increase in the number of rats presenting contralateral activity compared to L-DOPA injected alone (Table 2). The additional noradrenergic lesion (6-OHDA+DSP-4 group) did not decrease the number of rats presenting turning behaviour after L-DOPA and caffeine co-administration (Table 2).

3.5. Relevance of the noradrenergic system integrity on the number of total turns and the pooled temporal pattern of rotation

3.5.1. Number of total turns

The ~28% of single-lesioned (6-OHDA) rats that exhibited turning behaviour with L-DOPA showed a mean of 177 ± 55 total contralateral turns. The blockade of adenosinergic receptors by a single administration of caffeine produced a total score of 219 ± 96 contralateral turns (Fig. 1A). This was not significantly different to the number of turns obtained in the L-DOPA-treated group. In contrast, acute co-administration of L-DOPA+caffeine in the 6-OHDA group produced an expected increase in the contralateral motor activity (mean number of total turns of 984 ± 490) and this was significantly different from that observed after a single administration of L-DOPA or caffeine ($p<0.05$) (Fig. 1A).

The mean number of total rotations in rats that showed contralateral activity after each of the three treatment, did not differ significantly between double-lesioned (6-OHDA+DSP-4) and single-lesioned (6-OHDA) animals (202 ± 98 after L-DOPA; 205 ± 85 after caffeine; and 897 ± 452 after L-DOPA+caffeine).

Similar to observations in single-lesioned animals, total turns after L-DOPA+caffeine in double-lesioned animals were significantly different to the number of turns observed after

administration of L-DOPA or caffeine alone ($p<0.05$) (Fig. 1B).

3.5.2. Pooled temporal pattern of rotation

No significant differences were observed between single- and double-denervated animals in any of the three conditions (Table 3).

Single-lesioned rats. Rotating activity in animals treated with L-DOPA lasted ~60min (Table 3A). In contrast, when L-DOPA and caffeine were injected together, the turning behaviour was observed for ~180min (data not shown). In this case, significant differences were also observed in the respective pooled rotations during the first ~60min as compared to those seen after L-DOPA or caffeine treatments (Table 3A).

Double-lesioned rats. No changes in motor activity profile were observed after saline injection. Rotating activity after L-DOPA administration also lasted 60min and the number of pooled turns observed after the first ~20min of its administration differed significantly from caffeine-treated rats (Table 3B).

The pooled activity seen after caffeine was injected alone was not significantly different to that obtained after saline treatment.

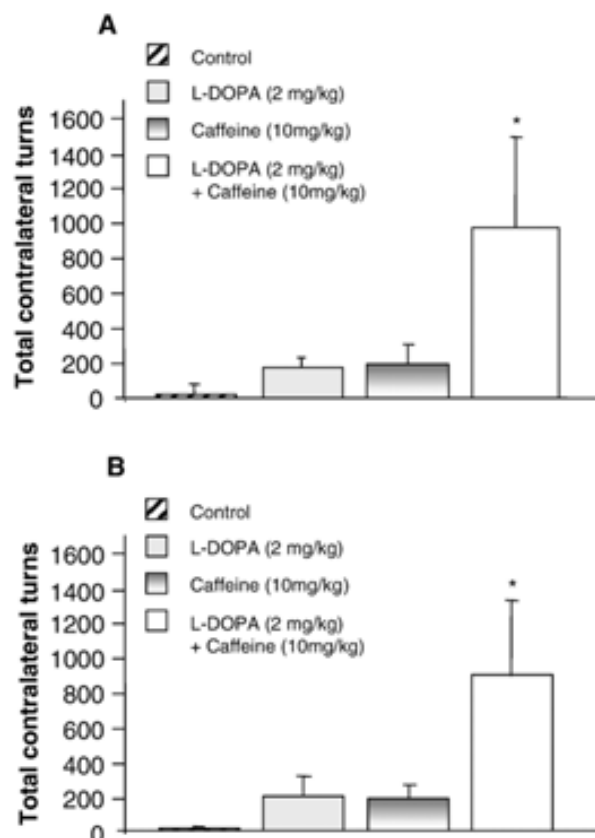


Fig. 1. Rotational behaviour induced by L-DOPA (2 mg/kg), caffeine (10 mg/kg) or L-DOPA+caffeine, in hemiparkinsonian rats. Rats were lesioned unilaterally by microinjection of 6-OHDA into left striatum (6-OHDA-lesioned group) (A). The half of this group received an injection of DSP-4 (6-OHDA+DSP-4-lesioned group) (B). The contralateral motor activity was recorded for 4 h after drug administrations. Each column represents the means of total counts (\pm S.D., $n=14$). (*) Significant differences compared with saline, L-DOPA or caffeine treatments, $p<0.05$, one-way ANOVA followed by a *post hoc* Student–Newman–Keuls test.

Table 3
Effect of dopaminergic and adenosinergic stimulation in the pattern of contralateral turning behaviour induced in 6-OHDA- or 6-OHDA+DSP-4-lesioned rats

Treatment	n	20'	40'	60'
<i>(A) Group of single 6-OHDA-lesioned animals</i>				
L-DOPA	4	71±11	80±30	33±13
Caffeine	6	39±19	43±19	38±14
L-DOPA+Caffeine	14	193±103 ^{a,b}	208±110 ^{a,b}	172±101 ^{a,b}
<i>(B) Group of double 6-OHDA+DSP-4-lesioned animals</i>				
L-DOPA	14	99±47 ^b	81±26	36±25
Caffeine	5	14±3	27±10	21±8
L-DOPA+Caffeine	14	184±85 ^b	228±101 ^{a,b}	195±107 ^{a,b}

Effects of acute administration of L-DOPA (2 mg/kg), caffeine (10 mg/kg) or L-DOPA+caffeine on the pattern of rotation induced in 6-OHDA (A) or 6-OHDA+DSP-4 (B) lesioned rats. The profile was obtained pooling turns in each lapses of 20 min during the first hour of rotation, and shows the means of total contralateral rotations (±S.D.; n=rats showing turning response after corresponding treatment in each group of 14 animals). Comparisons with L-DOPA^(a), or caffeine^(b), treatments were statistically significant, $p < 0.05$, one-way ANOVA followed by a *post hoc* Student–Newman–Keuls test.

The turning activity lasted ~140min after co-administration of caffeine and L-DOPA (data not shown). The corresponding pooled turns showed significant differences with the equivalent periods obtained after L-DOPA or caffeine administration ($p < 0.05$). Respect to L-DOPA treatment, differences were maintained after ~20min of rotation and the differences in the pooled turns respect to caffeine injection were observed during the first ~60min (Table 3B).

4. Discussion

The results from this study further support the observation that a combined lesion of dopaminergic and noradrenergic pathways in rats can help better define the dopaminergic response in Parkinson's disease treatment.

Contrary to the results observed in the MPTP-mouse model (Archer and Fredriksson, 2006; Nishi et al., 1991), our findings add further weight to recent evidence that an additional noradrenergic lesion in the 6-OHDA rat model modifies the motor behaviour induced by acute dopaminergic stimulation, increasing the response to L-DOPA (Srinivasan and Schmidt, 2003).

In agreement with other authors, our results show that unilateral nigrostriatal 6-OHDA lesions reduce the concentration of dopamine in the lesioned striatum (Prats et al., 2000; Srinivasan and Schmidt, 2003, 2004; Tanaka et al., 1999). Besides, DSP-4, a noradrenergic neurotoxin highly specific to the nerve terminals originating from the *locus coeruleus* (Fritschy and Grzanna, 1989; Jonsson et al., 1981; Ross, 1976), produced a drastic decrease in noradrenaline levels in hippocampus (Archer and Fredriksson, 2006; Fornai et al., 1997, 1999; Srinivasan and Schmidt, 2003, 2004).

Although the main purpose of our work was to study the double-denervation model from a pharmacological perspective, the mechanisms underlying the diminution of the L-DOPA threshold should be considered. It has previously been observed that the dopaminergic toxicity with 6-OHDA may increase

when the *locus coeruleus* is damaged (Srinivasan and Schmidt, 2003). Thus, it could be argued that the increase in the L-DOPA response observed in our study may be solely due to a more extensive dopaminergic denervation of the animals. However, our animals were selected on the basis of showing more than 100 contralateral turns in the apomorphine test and this corresponds to at least 95% of dopamine depletion (Casas et al., 1999; Papa et al., 1994).

We cannot exclude a role of other neurotransmitters, such as serotonin, in the observed response. Serotonergic hyperinnervation into the 6-OHDA-lesioned striatum (Maeda et al., 2003, 2005) might have facilitated a higher conversion to dopamine from exogenous L-DOPA (Maeda et al., 2005; Tanaka et al., 1999). Consequently, the heterogeneity of the nigrostriatal neuron degeneration induced by the 6-OHDA administration could produce small shifts in the dopamine availability from a threshold L-DOPA dose that would explain the heterogeneous turning response. Thus, although the 2mg/kg L-DOPA dose may be sufficient to produce a biological response (Fenu et al., 1997), it is insufficient to induce the rotational activity (Fenu et al., 1997; Fredduzzi et al., 2002; Pinna et al., 2001) observed with a slightly higher dose (Koga et al., 2000).

An additional noradrenergic lesion might perhaps contribute to homogenise the optimal extracellular dopamine availability, inducing the turning behaviour without affecting time or total activity. Furthermore, stimulation of dopaminergic-induced turning activity in 6-OHDA-lesioned rats by the adrenergic α_2 -receptor antagonist idazoxan was related with increases in the serotonergic transmission (Srinivasan and Schmidt, 2005). A possible mechanism by which the additional noradrenergic lesion facilitates extracellular dopamine availability could be related to the increase in striatal serotonergic activity after noradrenergic impairment.

This effect would perhaps be originated by the lack of specificity of DSP-4 actions, although it has been shown that the incidence of this noradrenergic toxin on serotonin levels varies greatly from study to study (Fornai et al., 1996; Ross, 1976; Srinivasan and Schmidt, 2003, 2004). Specific degeneration of the *locus coeruleus* by stereotaxic lesion could help to clarify whether striatal serotonergic transmission is modified by noradrenergic impairment. Were this found to occur, serotonin activity could be a mechanism by which noradrenergic neurodegeneration sensitises dopamine motor activity.

An alternative explanation could be dopaminergic receptor upregulation after additional noradrenergic depletion (Alittoa et al., 2005; Harro et al., 2000, 2003). Additionally, upregulation of striatal α_{2C} -adrenoceptors (Ordway, 1995), which can be stimulated by *de novo* dopamine and noradrenaline synthesised after exogenous L-DOPA (Chalmers et al., 1971; Zhang et al., 1999), might also contribute to the increase in dopaminergic sensitivity. One may wonder why if receptor upregulation has been produced by the addition of noradrenergic lesion, this only affects the L-DOPA threshold, leaving the response amplitude unaltered. This merits further investigation. However, an all-or-nothing response is the usual case in Parkinson's disease patients exhibiting the wearing-off motor response to L-DOPA. In these patients, the magnitude of the motor responses to a L-

DOPA challenge undergoes no further improvement if the L-DOPA dose is increased beyond a certain threshold (Nutt and Holford, 1996).

We also studied the influence of another neurotransmitter system on the L-DOPA response of double-denervated animals. Stimulant effects in locomotor behaviour induced by caffeine, a non-selective adenosinergic receptor antagonist, could be mediated through blockade of adenosine A_{2A} receptors (El Yacoubi et al., 2000; Lindskog et al., 2002; Svenningsson et al., 1997) that have been upregulated in the lesioned striatum after dopaminergic neurodegeneration (Pinna et al., 2002). In our study, contralateral motor activity was induced by caffeine (10mg/kg) in ~40% of 6-OHDA-lesioned rats. The signalling pathway linked to the adenosinergic A_{2A} receptor blockade that induces turning activity (Lindskog et al., 2002) is probably not sufficiently stimulated when this dose of caffeine is administered alone. Although striatal dopaminergic metabolism is increased in DSP-4-lesioned rats (Altoa et al., 2005), it is unlikely that it contributed to modulating motor activity, because saline-treated rats did not rotate after a noradrenergic lesion. Similar behaviour was observed in the 6-OHDA group (data not shown). Our results indicate that although reactivity to the same dose of caffeine was lower in double-degenerated rats (~36%), the number of animals that presented turning behaviour and the number of rotations observed were not significantly different from those of 6-OHDA-lesioned rats. These small but not significant differences in turning behaviour after caffeine challenge perhaps indicate that noradrenergic and adenosinergic systems could interact in 6-OHDA-lesioned rats. This possibility merits further investigation before conclusions can be reached. The use of adenosinergic A_{2A} receptor specific antagonists may help to clarify this matter.

On the other hand, adenosinergic and dopaminergic interactions at the behavioural level are based on the existence of adenosine/dopamine A_{2A}/D_2 heterodimers in the somatodendritic region of the striatopallidal GABA neurons where the adenosinergic A_{2A} receptors antagonize dopaminergic D_2 signalling (Canals et al., 2003; Fuxe et al., 2003). It is well known that low doses of L-DOPA are sufficient to induce turning behaviour in hemiparkinsonian rats when adenosinergic activity is blocked by specific adenosine A_{2A} -receptor antagonists (Fenu et al., 1997; Pinna et al., 2001). Our results in the single-lesioned (6-OHDA) animals show that this is also true when a non-specific adenosinergic antagonist such as caffeine is used. The mechanism by which caffeine increases L-DOPA turning behaviour could be related to the synergism of the adenosinergic/dopaminergic A_{2A}/D_2 heteroreceptor activity after adenosinergic blockade. This effect could be greater as the consequence of an increase in the striatal extracellular dopamine (Golembiowska and Dziubina, 2004a,b) by means of an increase in serotonin activity (Okada et al., 1999) when caffeine is administered together with L-DOPA. It could therefore be expected that the L-DOPA response would be further strengthened in double-lesioned animals exposed to the synergistic effects of caffeine and L-DOPA. Nevertheless, we did not observe such potentiation, suggesting that noradrenergic neurodegeneration in 6-OHDA-lesioned rats could induce the

maximum extracellular dopamine concentration synthesized by a low dose of L-DOPA. This mechanism could be similar to that produced by caffeine when it is administered together with the threshold L-DOPA dose to induce potentiation of the contralateral activity. A similar pattern of rotation with the two treatments (see Table 3) in single- and double-denervated rats might support this idea. Moreover, the absence of differences in total turns induced by L-DOPA or by caffeine between the two groups of lesioned rats may suggest that the additional noradrenergic lesion only affects the threshold for L-DOPA sensitivity. Specific *locus coeruleus* neurodegeneration followed by striatal microdialysis could help to clarify this hypothesis and determine the relevance of the non-specific actions induced by the DSP-4 toxin in this process.

Another explanation for non-significative differences in the turning activity induced by caffeine and L-DOPA between single- and double-denervated rats observed in our study could be related to an imbalance in the interaction of adenosinergic and dopaminergic receptors. Striatal dopamine D_2 receptor upregulation after a combined lesion contributes to the formation of different oligomer species of dopaminergic receptors (Zawarynski et al., 1998; Zhang et al., 1999), increasing dopamine availability after the threshold L-DOPA dose was administered. This new scenario of redistribution of dopaminergic receptors might not affect the antagonistic adenosine/dopamine A_{2A}/D_2 heteroreceptor activity (Ferre et al., 1997) in the striatopallidal GABA pathway (Fuxe et al., 1998) of the dopamine-denervated striatum (Tanganelli et al., 2004) and would therefore have no effect on an expected caffeine potentiation of L-DOPA motor response when *locus coeruleus* is neurodegenerated. Fluorescence studies of dopaminergic receptor subpopulations in noradrenaline-depleted animals would clarify this matter.

The present study adds further insight into the influence of the noradrenergic network on the regulation of the L-DOPA motor response and suggests that the noradrenergic lesion associated with the neurodegenerative process of Parkinson's disease does not seem to modify the motor response to caffeine, a non-specific adenosinergic A_{2A} -receptor antagonist. This may further support the clinical strategy of complementary treatment with adenosine A_{2A} receptor antagonists in Parkinson's disease patients.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the FIS 405/707, from the Fundación M^a Francisca de Roviralt and from CIBERNED. The authors thank Manel Pastó (Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona) and Luis Garcia Tato for technical assistance.

References

- Altoa, A., Koiv, K., Eller, M., Uustare, A., Rinken, A., Harro, J., 2005. Effects of low dose *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine administration on exploratory and amphetamine-induced behavior and dopamine D_2 receptor function in rats with high or low exploratory activity. *Neuroscience* 132, 979–990.

- Archer, T., Fredriksson, A., 2006. Influence of noradrenaline denervation on MPTP-induced deficits in mice. *J. Neural Transm.* 113, 1119–1129.
- Bezard, E., Brotchie, J.M., Gross, C.E., 2001. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 577–588.
- Bové, J., Marin, C., Bonastre, M., Tolosa, E., 2002. Adenosine A2A antagonism reverses Levodopa-induced motor alterations in hemiparkinsonian rats. *Synapse* 46, 251–257.
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S.R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L.F., Woods, A.S., Ferre, S., Lluís, C., Bouvier, M., Franco, R., 2003. Adenosine A2A–dopamine D2 receptor–receptor heterodimerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* 278, 46741–46749.
- Casas, M., Prat, G., Robledo, P., Barbanof, M., Kulisevsky, J., Jane, F., 1999. Scopolamine prevents tolerance to the effects of caffeine on rotational behavior in 6-hydroxydopamine-denervated rats. *Eur. J. Pharmacol.* 366, 1–11.
- Casas, M., Prat, G., Rubio, A., Barbanof, M., Jané, F., 2000. Lack of synergism between caffeine and SKF 38393 on rotational behavior in 6-hydroxydopamine-denervated rats. *Eur. J. Pharmacol.* 396, 93–99.
- Chalmers, J.P., Baldessarini, R.J., Wurtman, R.J., 1971. Effects of L-DOPA on norepinephrine metabolism in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 662–666.
- Chopin, P., Colpaert, F.C., Marien, M., 1999. Effects of alpha-2 adrenoceptor agonists and antagonists on circling behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 798–804.
- Cotzias, G.C., Van Woert, M.H., Schiffer, L.M., 1967. Aromatic aminoacids and modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* 276, 374–379.
- El Yacoubi, M., Ledent, C., Menard, J.F., Parmentier, M., Costentin, J., Vaugeois, J.M., 2000. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1465–1473.
- Fenu, S., Pinna, A., Ongini, E., Morelli, M., 1997. Adenosine A2A receptor antagonism potentiates L-DOPA-induced turning behaviour and *c-fos* expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur. J. Pharmacol.* 321, 143–147.
- Ferre, S., Popoli, P., Tinner-Staines, B., Fuxe, K., 1996. Adenosine A1 receptor–dopamine D1 receptor interaction in the rat limbic system: modulation of dopamine D1 receptor antagonist binding sites. *Neurosci. Lett.* 208, 109–112.
- Ferre, S., Fredholm, B.B., Morelli, M., Popoli, P., Fuxe, K., 1997. Adenosine–dopamine receptor–receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 20, 482–487.
- Fornai, F., Bassi, L., Torracca, M.T., Scalori, V., Corsini, G.U., 1995. Norepinephrine loss exacerbates methamphetamine-induced striatal dopamine depletion in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 283, 99–102.
- Fornai, F., Bassi, L., Torracca, M.T., Alessandri, M.G., Scalori, V., Corsini, G.U., 1996. Region- and neurotransmitter-dependent species and strain differences in DSP-4-induced monoamine depletion in rodents. *Neurodegeneration* 5, 241–249.
- Fornai, F., Bassi, L., Bonaccorsi, I., Giorgi, F., Corsini, G.U., 1997. Noradrenaline loss selectivity exacerbates nigrostriatal toxicity in different species of rodents. *Funct. Neurol.* 12, 193–198.
- Fornai, F., Alessandri, M.G., Torracca, M.T., Bassi, L., Scalori, V., Corsini, G.U., 1998. Noradrenergic modulation of methamphetamine-induced striatal dopamine depletion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 844, 166–177.
- Fornai, F., Giorgi, F.S., Alessandri, M.G., Giusiani, M., Corsini, G.U., 1999. Effects of pretreatment with *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) on methamphetamine pharmacokinetics and striatal dopamine losses. *J. Neurochem.* 72, 777–784.
- Fox, S.H., Henry, B., Hill, M.P., Peggs, D., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., 2001. Neural mechanisms underlying peak-dose dyskinesia induced by levodopa and apomorphine are distinct: evidence from the effects of the alpha(2) adrenoceptor antagonist idazoxan. *Mov. Disord.* 16, 642–650.
- Fredduzzi, S., Moratalla, R., Monopoli, A., Cuellar, B., Xu, K., Ongini, E., Impagnatiello, F., Schwarzschild, M.A., Chen, J.F., 2002. Persistent behavioral sensitization to chronic L-DOPA requires A2A adenosine receptors. *J. Neurosci.* 22, 1054–1062.
- Fritschy, J.M., Grzanna, R., 1989. Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience* 30, 181–197.
- Fuxe, K., Ungerstedt, U., 1974. Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. *Med. Biol.* 52, 48–54.
- Fuxe, K., Ferré, S., Zoli, M., Agnati, L.F., 1998. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* 26, 258–273.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Jacobsen, K., Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Tinner-Staines, B., Staines, W., Rosin, D., Terasmaa, A., Popoli, P., Leo, G., Vergoni, V., Lluís, C., Ciruela, F., Franco, R., Ferre, S., 2003. Receptor heteromerization in adenosine A(2A) receptor signalling: relevance for striatal function and Parkinson's disease. *Neurology* 61, S19–S23.
- Golembiowska, K., Dziubina, A., 2004a. Effect of the adenosine A2A receptor antagonist 8-(3-chlorostyryl)caffeine on L-DOPA biotransformation in rat striatum. *Brain Res.* 998, 208–217.
- Golembiowska, K., Dziubina, A., 2004b. Striatal adenosine A(2A) receptor blockade increases extracellular dopamine release following L-DOPA administration in intact and dopamine-denervated rats. *Neuropharmacology* 47, 414–426.
- Grondin, R., Hadj, T.A., Doan, V.D., Ladure, P., Bedard, P.J., 2000. Noradrenoceptor antagonism with idazoxan improves L-DOPA-induced dyskinesias in MPTP monkeys. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 361, 181–186.
- Haapalinn, A., Leino, T., Heinonen, E., 2003. The alpha 2-adrenoceptor antagonist atipamezole potentiates anti-Parkinsonian effects and can reduce the adverse cardiovascular effects of dopaminergic drugs in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 368, 342–351.
- Harro, J., Merikula, A., Lepiku, M., Modiri, A.R., Rinken, A., Orelund, L., 2000. Lesioning of locus coeruleus projections by DSP-4 neurotoxin treatment: effect on amphetamine-induced hyperlocomotion and dopamine D2 receptor binding in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 86, 197–202.
- Harro, J., Terasmaa, A., Eller, M., Rinken, A., 2003. Effect of denervation of the locus coeruleus projections by DSP-4 treatment on [3H]-raclopride binding to dopamine D(2) receptors and D(2) receptor-G protein interaction in the rat striatum. *Brain Res.* 976, 209–216.
- Henry, B., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., 1998. Characterization of enhanced behavioral responses to L-DOPA following repeated administration in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 151, 334–342.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., Canela, E.I., Zoli, M., Agnati, L.F., Ibanez, C.F., Lluís, C., Franco, R., Ferre, S., Fuxe, K., 2002. Coaggregation cointernalization and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 18091–18097.
- Hornykiewicz, O., Kish, S.J., 1987. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 45, 19–34.
- Jonsson, G., Hallman, H., Ponzio, F., Ross, S., 1981. DSP4 (*N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine) a useful denervation tool for central and peripheral noradrenaline neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 72, 173–188.
- Kanda, T., Jackson, M.J., Smith, L.A., Pearce, R.K., Nakamura, J., Kase, H., Kuwana, Y., Jenner, P., 2000. Combined use of the adenosine A(2A) antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. *Exp. Neurol.* 162, 321–327.
- Koga, K., Kurokawa, M., Ochi, M., Nakamura, J., Kuwana, Y., 2000. Adenosine A(2A) receptor antagonists KF17837 and KW-6002 potentiate rotation induced by dopaminergic drugs in hemi-Parkinsonian rats. *Eur. J. Pharmacol.* 408, 249–255.
- Lane, E.L., Cheetham, S., Jenner, P., 2005. Dopamine uptake inhibitor-induced rotation in 6-hydroxydopamine-lesioned rats involves both D1 and D2 receptors but is modulated through 5-hydroxytryptamine and noradrenaline receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 1124–1131.
- Lindskog, M., Svenningsson, P., Pozzi, L., Kim, Y., Fienberg, A.A., Bibb, J.A., Fredholm, B.B., Nairn, A.C., Greengard, P., Fisone, G., 2002. Involvement

- of DARP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature* 418, 774–778.
- Maeda, T., Kannari, K., Shen, H., Arai, A., Tomiyama, M., Matsunaga, M., Suda, T., 2003. Rapid induction of serotonergic hyperinnervation in the adult rat striatum with extensive dopaminergic denervation. *Neurosci. Lett.* 343, 17–20.
- Maeda, T., Nagata, K., Yoshida, Y., Kannari, K., 2005. Serotonergic hyperinnervation into the dopaminergic denervated striatum compensates for dopamine conversion from exogenously administered L-DOPA. *Brain Res.* 1046, 230–233.
- Marien, M., Briley, M., Colpaert, F., 1993. Noradrenaline depletion exacerbates MPTP-induced striatal dopamine loss in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 236, 487–489.
- Marsden, C.D., Parkes, J.D., 1976. “On–off” effects in patients with Parkinson’s disease on chronic levodopa therapy. *Lancet* 1, 292–296.
- Mavridis, M., Degryse, A.D., Lategan, A.J., Marien, M.R., Colpaert, F.C., 1991a. Effects of locus coeruleus lesions on parkinsonian signs striatal dopamine and substantia nigra cell loss after 1-methyl-4-phenyl-1236-tetrahydropyridine in monkeys: a possible role for the locus coeruleus in the progression of Parkinson’s disease. *Neuroscience* 41, 507–523.
- Mavridis, M., Colpaert, F.C., Millan, M.J., 1991b. Differential modulation of (+)-amphetamine-induced rotation in unilateral substantia nigra-lesioned rats by alpha 1 as compared to alpha 2 agonists and antagonists. *Brain Res.* 562, 216–224.
- Morelli, M., 2003. Adenosine A2A antagonists: potential preventive and palliative treatment for Parkinson’s disease. *Exp. Neurol.* 184, 20–23.
- Nishi, K., Kondo, T., Narabayashi, H., 1991. Destruction of norepinephrine terminals in 1-methyl-4-phenyl-1236-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice reduces locomotor activity induced by L-DOPA. *Neurosci. Lett.* 123, 244–247.
- Nutt, J.G., Holford, N.H., 1996. The response to levodopa in Parkinson’s disease: imposing pharmacological law and order. *Ann. Neurol.* 39, 561–573.
- Obeso, J.A., Olanow, C.W., Nutt, J.G., 2000. Levodopa motor complications in Parkinson’s disease. *Trends Neurosci.* 23 (10 Suppl), S2–S7 Review.
- Okada, M., Kawata, Y., Murakami, T., Wada, K., Mizuno, K., Kondo, T., Kaneko, S., 1999. Differential effects of adenosine receptor subtypes on release and reuptake of hippocampal serotonin. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1–9.
- Ordway, G.A., 1995. Effect of noradrenergic lesions on subtypes of alpha 2-adrenoceptors in rat brain. *J. Neurochem.* 64, 1118–1126.
- Papa, S.M., Engber, T.M., Kask, A.M., Chase, T.N., 1994. Motor fluctuations in levodopa-treated parkinsonian rats: relation to lesion extent and treatment duration. *Brain Res.* 662, 69–74.
- Paxinos, G., Watson, C., 1982. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Pérez, V., Unzeta, M., 2003. PF 9601N [*N*-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl)methylamine] a new MAO-B inhibitor attenuates MPTP-induced depletion of striatal dopamine levels in C57/BL6 mice. *Neurochem. Int.* 42, 221–229.
- Pinna, A., Fenu, S., Morelli, M., 2001. Motor stimulant effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58261 do not develop tolerance after repeated treatments in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Synapse* 39, 233–238.
- Pinna, A., Corsi, C., Carta, A.R., Valentini, V., Pedata, F., Morelli, M., 2002. Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A2A receptor mRNA by dopamine denervation. *Eur. J. Pharmacol.* 446, 75–82.
- Prats, G., Pérez, V., Rubio, A., Casas, M., Unzeta, M., 2000. The novel type b MAO inhibitor PF9601N enhances the duration of L-DOPA-induced contralateral turning in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *J. Neural Transm.* 107, 409–417.
- Rascol, O., Arnulf, I., Peyro-Saint, P.H., Brefel-Courbon, C., Vidailhet, M., Thalamas, C., Bonnet, A.M., Descombes, S., Bejjani, B., Fabre, N., Montastruc, J.L., Agid, Y., 2001. Idazoxan an alpha-2 antagonist and L-DOPA-induced dyskinesias in patients with Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* 16, 708–713.
- Ross, S.B., 1976. Long-term effects of *N*-2-chlorethyl-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine.HCl on noradrenergic neurones in the rat brain and heart. *Br. J. Pharmacol.* 58, 521–527.
- Savola, J.M., Hill, M., Engstrom, M., Merivuori, H., Wurster, S., McGuire, S.G., Fox, S.H., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., 2003. Fipamezole (JP-1730) is a potent alpha2 adrenergic receptor antagonist that reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* 18, 872–883.
- Srinivasan, J., Schmidt, W.J., 2003. Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2586–2592.
- Srinivasan, J., Schmidt, W.J., 2004. Treatment with alpha2-adrenoceptor antagonist 2-methoxy idazoxan protects 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian symptoms in rats: neurochemical and behavioral evidence. *Behav. Brain Res.* 154, 353–363.
- Srinivasan, J., Schmidt, W.J., 2005. Serotonergic influence on the potentiation of d-amphetamine and apomorphine-induced rotational behavior by the alpha (2)-adrenoceptor antagonist 2-methoxy idazoxan in hemiparkinsonian rats. *J. Neural Transm.* 112, 1223–1236.
- Svenningsson, P., Nomikos, G.G., Ongini, E., Fredholm, B.B., 1997. Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience* 79, 753–764.
- Svenningsson, P., Fourreau, L., Bloch, B., Fredholm, B.B., Gonon, F., Le Moine, C., 1999. Opposite tonic modulation of dopamine and adenosine on *c-fos* gene expression in striatopallidal neurons. *Neuroscience* 89, 827–837.
- Tanaka, H., Kannari, K., Maeda, T., Tomiyama, M., Suda, T., Matsunaga, M., 1999. Role of serotonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport* 10, 631–634.
- Tanganelli, S., Nielsen, K.S., Ferraro, L., Antonelli, T., Kehr, J., Franco, R., Ferré, S., Agnati, L.F., Fuxe, K., Scheel-Krüger, J., 2004. Striatal plasticity at the network level. Focus on adenosine A2A and D2 interactions in models of Parkinson’s Disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 10, 273–280.
- Ungerstedt, U., 1971. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367, 69–93.
- Zawarynski, P., Tallerico, T., Seeman, P., Lee, S.P., O’Dowd, B.F., George, S.R., 1998. Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain. *FEBS Lett.* 441, 383–386.
- Zhang, W., Klimek, V., Farley, J.T., Zhu, M.Y., Ordway, G.A., 1999. alpha2C adrenoceptors inhibit adenylyl cyclase in mouse striatum: potential activation by dopamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1286–1292.

ANEXO II:

Artículo

“Noradrenergic modulation of the motor response induced by long-term levodopa administration in Parkinsonian rats”

Por Perez V, **Sosti V**, Rubio A, Barbanoj M, Gich I, Rodríguez-Alvarez J, Kulisevsky J.

J Neural Transm, 2009. **116**(7): p. 867-74.

Noradrenergic modulation of the motor response induced by long-term levodopa administration in Parkinsonian rats

Virgili Pérez · Victoria Sosti · Antonia Rubio ·
Manel Barbanoj · Ignasi Gich ·
José Rodríguez-Álvarez · Jaime Kulisevsky

Received: 11 February 2009 / Accepted: 6 May 2009 / Published online: 26 May 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract A decrease in noradrenergic activity in Parkinson's disease might play a critical role in long-term motor complications associated with chronic dopaminergic replacement. Using the rat model of parkinsonism with an additional noradrenergic degeneration induced by the N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) toxin we evaluated whether the circling motor activity and dose-failure episodes induced by levodopa (L-DOPA) differ between single (6-OHDA) and double (6-OHDA + DSP-4) denervated animals challenged with a single daily dose of L-DOPA. While single-lesioned animals showed a sensitization–desensitization turning response with a significant increase on day 15 and a decrease on day 22, in double-lesioned animals, the turning activity was maximal from day 1 and did not decay on day 22. Double-lesioned rats exhibited significantly higher number of turns on days 15 and 22 and a significantly lower percentage of dose-failure episodes during treatment. Noradrenergic denervation appears to be associated with prolonged long-term

dopaminergic sensitization. This type of response appears to be comparable to that in the clinical setting with intermittent L-DOPA administration where no desensitization occurs once the abnormal response is established.

Keywords Parkinson model · 6-Hydroxydopamine · DSP-4 · Turning behaviour · L-DOPA · *Locus coeruleus*

Introduction

L-DOPA is the most reliable and effective drug for management of Parkinson's disease. Nevertheless, the benefits with chronic dopaminergic replacement treatment are limited by the development of serious side effects such as the wearing-off of the motor response, the appearance of dyskinesias and episodic failure of the usual L-DOPA dose to provide motor improvement (Ahlskog and Muentner 2001). Motor complications induced through repeated L-DOPA treatment in patients with Parkinson's disease are thought to be the consequence of molecular adaptations that occur in response to repeated dopamine receptor stimulation. It has been proposed that there is an imbalance between the striatal output pathways, caused by the abnormal pulsatile stimulation of denervated medium spiny striatal neurons with short-acting drugs such as L-DOPA leading to gene changes and altered firing patterns in basal ganglia output neurons (Fabbrini et al. 2007).

Although Parkinson's disease is a multisystem disorder, most experimental knowledge of the consequences of chronic dopaminergic treatment has been inferred from purely dopaminergic lesioned animal models (Chase and Oh 2000). This approach underscores other crucial deficits such as the important loss of cells in the *locus coeruleus*, which contains the largest group of noradrenergic neurons

V. Pérez · V. Sosti · A. Rubio · M. Barbanoj · I. Gich ·
J. Kulisevsky

Laboratori de Neuropsicofarmacologia, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau, Avgda Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain

V. Pérez · J. Rodríguez-Álvarez · J. Kulisevsky
Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

J. Rodríguez-Álvarez
Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona,
Campus UAB, 08193 Bellaterra, Spain

J. Kulisevsky (✉)
Servei de Neurologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,
Avgda Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain
e-mail: jkulisevsky@sanpau.cat

in the brain (Hornykiewicz and Kish 1987; Zarow et al. 2003). Experimental data suggest that the integrity of the noradrenergic system is neuroprotective while degeneration of the *locus coeruleus* sensitizes dopaminergic neurons to damage (Fornai et al. 1995, 1999, 2007; Rommelfanger and Weinshenker 2007). Furthermore, administration of the adrenergic α_2 -receptor antagonists, which are also expressed in striatal spiny neuron dendrites, may reduce dyskinesias both in experimental models of parkinsonism (Grondin et al. 2000; Fox et al. 2001; Savola et al. 2003) and in Parkinson's disease patients (Rascol et al. 2001). Accordingly, it could prove useful to take the dopamine–noradrenaline interaction into account when examining the behavioural effects of antiparkinsonian drugs in animal models of Parkinson's disease (Jenner 2002) so as to understand the long-term changes in dopaminergic response and to improve pharmacological strategies for the long-term motor complications of Parkinson's disease.

Using dopaminergic-lesioned rats with an additional noradrenergic lesion we previously found that noradrenergic denervation selectively decreased the motor threshold to an acute dose of L-DOPA (Pérez et al. 2007). In the present study we investigated whether loss of the noradrenergic system integrity might also modulate the long-term motor response to chronic intermittent dopaminergic replacement.

Materials and methods

Animals

Sprague-Dawley male rats weighing 70–100 g were obtained from Charles River (France) and housed three per cage under standard conditions of temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and a 12-h light/dark cycle (lights on at 08.00 hours). Rats were allowed free access to commercial pellets and water. All experimental procedures were conducted in compliance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) of 24 November 1986 for care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimise the number of animals used and their suffering.

Noradrenergic lesion

Animals were injected with the noradrenergic toxin (DSP-4, 50 mg/kg i.p., Sigma) to selectively denervate the *locus coeruleus*-noradrenergic terminal fields (Fritschy and Grzanna 1991). DSP-4 was dissolved in saline and administered immediately, 7 days before the dopaminergic neurodegeneration was performed.

Unilateral dopaminergic-lesion in the medial forebrain bundle

To protect the noradrenergic neurons from 6-OHDA damage, the noradrenaline uptake inhibitor desipramine (25 mg/kg, i.p., Sigma) was intraperitoneally injected 30 min prior to 6-OHDA injections. Rats weighing 170 ± 15 g were anaesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (50:5.3 mg/kg i.p.), and placed in a David Kopf stereotaxic frame. For dopaminergic lesions, 8 μg of 6-OHDA (Sigma) was injected into the left medial forebrain bundle (A: -4.4 mm, L: -1.2 mm, V: -7.8 mm, from bregma) as has been previously described (Casas et al. 1999).

Selection of the dopaminergic-depleted rats

Three weeks after performing the 6-OHDA-induced lesions, the rats were screened according to their capacity to rotate in response to apomorphine (0.05 mg/kg, s.c., Sigma) (Casas et al. 1999).

Rotational behaviour was recorded using a computerized system (Panlab, S.A., Barcelona, Spain). Animals were placed in plastic hemispheric bowls (40 cm in diameter), attached to a harness and connected to photoelectric detectors. On test days, rats were weighed, placed in test bowls and allowed to acclimatize for at least 20 min before testing.

The net contralateral motor activity was measured by counting the total number of contralateral turns after deduction of the ipsilateral rotations (Carta et al. 2007). Only rats exhibiting more than 100 contralateral turns during the 1-h testing period of the apomorphine test were selected (rats meeting this criterion have greater than 95% depletion of striatal dopamine) (Papa et al. 1994). Rats were randomly distributed in the study groups to minimize the typical individual heterogeneity of the rotational activity.

Study groups

Thirty 6-OHDA- and 30 6-OHDA + DSP-4-lesioned rats, previously selected by the apomorphine test, were included in the study as indicated in the following table:

Administration (i.p.)	Stereotaxic injection	
	Saline	6-OHDA
Saline	10 Rats	30 Rats
DSP-4	10 Rats	30 Rats

Turning behaviour was evaluated throughout long-term treatment in the following groups: (a) 12 6-OHDA-lesioned

rats and (b) 12 6-OHDA + DSP-4-lesioned rats, that received saline; (c) 18 6-OHDA-lesioned rats and (d) 18 6-OHDA + DSP-4-lesioned rats, that received L-DOPA (25 mg/kg i.p., Sigma) 30 min after benserazide administration (10 mg/kg i.p.). Sham groups (a group of ten saline-injected animals and a group of ten DSP-4-saline injected animals) also received the L-DOPA treatment.

As groups a and b, and sham-lesioned animals did not show rotational activity during treatment the respective data were not included in Results.

Drug treatment and considered variables

L-DOPA treatment was initiated in the selected rats 7 days after the last apomorphine test and consisted of one daily dose every 24 h for 22 consecutive days. Both control groups received a daily injection of saline for the same period of time.

Experimental data for evaluating the effect of noradrenergic degeneration on the rotational behaviour response were collected in the 4 h after dosing on days 1, 8 15 and 22 of chronic treatment. Dose failure in rats was defined as a lack of motor response after the L-DOPA-administration.

Considered for statistical purposes were: (1) the percentage of dose-failure episodes, taken as an index of motor desensitization; (2) the magnitude of the response to each single L-DOPA dose throughout treatment expressed as the number of net contralateral turns, which was taken as an index of the motor sensitization and (3) the temporal pattern of rotation, taken as an index of the kinetic profile modulation of each single L-DOPA dose. This temporal pattern of rotation was evaluated by pooling the motor activity in lapses of 20 min and considering the first 2 h for statistical purposes.

Determination of catecholamines

The degree of dopaminergic neurodegeneration induced by 6-OHDA and the noradrenergic neurodegeneration induced by DSP-4 were evaluated as previously described (Pérez et al. 2007). The dopaminergic lesion was evaluated by analysing the striatal levels of dopamine and its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in both hemispheres. The noradrenergic neurodegeneration induced by DSP-4 was evaluated analysing the hippocampal levels of noradrenaline. Seven days after the last injection of L-DOPA, rats were killed by an injection of ketamine (50 mg/kg i.p.) and xylazine (5.3 mg/kg i.p.). Brains were immediately removed from the skull and placed on ice-chilled Petri dishes. Brain structures, striatum and hippocampus of both hemispheres were dissected from the preparation and the tissues were immediately placed on dry ice and stored in a freezer at -70°C

until analysis. The concentrations of dopamine, DOPAC and HVA in striatum and noradrenaline in hippocampus were analysed by high-pressure liquid chromatography coupled to an electrochemical detector (Pérez and Unzeta 2003).

Data analysis and statistics

Statistical analysis of rotational data was performed on mean differences during L-DOPA -treatment using a linear mixed model (LMN) as the primary method to investigate the interaction of lesion, day and treatment, with the SPSS Mixed procedure (version 15.0.1). Appropriate covariance structure was determined using Akaike's and Schwarz's information criteria. The method used was restricted maximum likelihood and the normality for residuals was evaluated with a Kolmogorov-Smirnov test. Yate's Chi-square test method was used to compare proportions. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Striatal dopamine and hippocampal noradrenaline depletions induced by the administration of 6-OHDA and DSP-4 toxins

Striatal dopamine, DOPAC and HVA contents of the animals selected for this study were drastically reduced on the lesioned side as compared to the non-lesioned side (Pérez et al. 2007; Prat et al. 2000; Srinivasan and Schmidt 2003) (Table 1). As shown in Table 1, DSP-4 toxicity was confirmed by the lack of detection of noradrenaline in the analysed hippocampus (Pérez et al. 2007; Srinivasan and Schmidt 2003).

Table 1 Striatal dopamine and hippocampal noradrenaline depletion after 6-OHDA and DSP-4 lesions in Sprague-Dawley rats

Lesion	Striatum			Hippocampus
	DA	DOPAC	HVA	NA
Saline	10125 ± 1137	1689 ± 415	704 ± 219	136 ± 12
6-OHDA	nd	nd	nd	140 ± 27
DSP-4	9854 ± 915	1725 ± 331	743 ± 186	nd
DSP-4 + 6-OHDA	nd	nd	nd	nd

Striatum and hippocampus were obtained from decapitated animals after sacrifice and tissues were dissected and homogenised. Supernatants were injected into HPLC for dopamine (DA), DOPAC and HVA striatal determination or noradrenaline (NA) determination in hippocampus. nd Represents values below limits of electrochemical detection. The results are expressed in picograms of DA, DOPAC, HVA or NA per mg of tissue as mean ± SD of 18 independent experiments in duplicate

Effect of noradrenergic degeneration in motor desensitisation during long-term intermittent L-DOPA treatment (dose-failure episodes)

Yates' Chi-square test showed that the number of rats that did not rotate after an injection of L-DOPA differed significantly between groups ($P < 0.05$; Table 2). While the percentage of non-rotating animals after the first injection of L-DOPA (day 1) was similar in both groups (~6%) the profile differed thereafter with increasingly larger number of rotating animals in the double-lesioned group ($P < 0.05$) on days 7 (30% in single- vs 10% in double-lesioned rats), 15 (~35 vs ~17%) and 22 (~30 vs ~6%; Table 2).

Effect of noradrenergic degeneration in motor sensitisation during long-term intermittent L-DOPA treatment (contralateral turning behaviour induced by L-DOPA)

Linear mixed model analysis showed significant effects in the lesion factor ($F_{1,39.780} = 6.462$, $P = 0.015$) and in the day factor ($F_{3,64.669} = 9.391$, $P < 0.001$), and their interaction showed a tendency towards significance ($F_{3,64.669} = 2.506$, $P = 0.067$; Fig. 1). Contralateral motor activity induced by L-DOPA was higher in double 6-OHDA + DSP-4 lesioned rats than in 6-OHDA-lesioned rats (estimated marginal mean \pm SEM: 1346 ± 98 vs 988 ± 100 , respectively).

Contralateral motor activity induced in 6-OHDA + DSP-4 lesioned rats was significantly affected through the long-term L-DOPA-treatment ($F_{3,61.069} = 5.377$, $P = 0.02$). Rotating animals in this group increased the number of contralateral turns over time. In relation to day 1, these increases were nearly significant on day 8 ($P = 0.051$) and significant on days 15 ($P = 0.002$) and 22 ($P = 0.06$). The difference between days 8, 15 and 22 was not significant (Fig. 1).

Contralateral motor activity induced in 6-OHDA-lesioned rats by L-DOPA was also significantly different throughout the long-term treatment ($F_{3,65.727} = 6.063$, $P = 0.001$). Rotating animals in this group showed a

Table 2 Motor failure through L-DOPA long-term treatment

	Day 1	Day 8	Day 15	Day 22
6-OHDA-lesioned rats	5.8	30.0 ^a	35.3 ^a	29.4 ^a
6-OHDA + DSP-4-lesioned rats	5.8	10.0	16.6	5.8

Turning activity was analysed over 22 days of L-DOPA administration (25 mg/kg/day) in 6-OHDA- and 6-OHDA + DSP-4-lesioned rats. Data represent the percentage of rats that presented motor failure on days 1, 8, 15 and 22 of treatment ($n = 18$)

^a Significant differences between groups on the same day of treatment. $P < 0.05$, Yates' Chi-square test

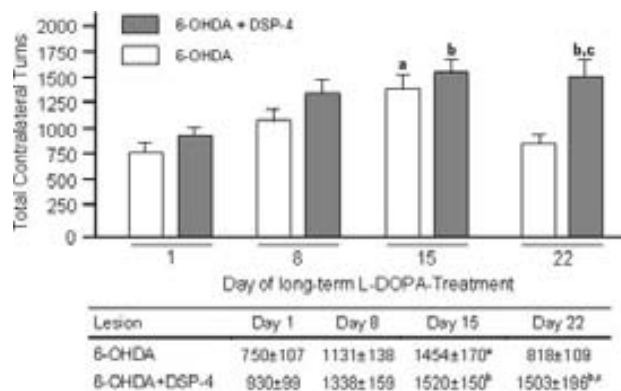


Fig. 1 Motor activity in 6-OHDA and 6-OHDA + DSP-4 lesioned rats induced by chronic administration of L-DOPA (25 mg/kg/day). Data were obtained on days 1, 8, 15 and 22 of treatment. Values represent the mean of total number of contralateral turns \pm SEM. *a* Significant differences in respect to days 1 and 22 in 6-OHDA-lesioned rats, *b* significant differences in respect to day 1 in 6-OHDA + DSP-4-lesioned rats and *c* shows significant differences in respect to day 22 in 6-OHDA-lesioned rats ($P < 0.05$)

progressive increase in the net number of contralateral turns over time. This increase on day 15 was statistically significant as compared to day 1 ($P = 0.02$). However, the turning activity on day 22 returned to values observed on day 1. This decrease was also statistically significant in relation to day 15 ($P = 0.006$; Fig. 1).

When comparing the turning activity induced by each dose of L-DOPA over the different days the only significant difference between the two lesioned groups was that observed on day 22. This showed that the 6-OHDA-lesioned rats had a lower turning activity than 6-OHDA + DSP-4 lesioned animals ($P = 0.01$; Fig. 1).

Dopaminergic kinetic profile modulation of each single L-DOPA dose

Pooled activity in lapses of 20 min between groups of single- and double-denervated rotating animals was compared when the long-term L-DOPA-treatment was started, and when it was completed (days 1 and 22; Fig. 2). LMN analysis showed significant effects in the lesion factor ($F_{1,54.938} = 10.137$, $P = 0.002$), in the day factor ($F_{1,124.244} = 16.277$, $P < 0.001$), in the time factor ($F_{5,284.460} = 3.525$, $P = 0.004$) and in the interaction between day and time ($F_{5,275.837} = 5.994$, $P < 0.001$). In addition, there was a tendency to be significant in the interaction between lesion and day ($F_{1,124.244} = 3.229$, $P = 0.075$; Fig. 2a, b).

Contralateral motor activity induced by L-DOPA was higher in double 6-OHDA + DSP-4 lesioned rats than in 6-OHDA-lesioned animals (estimated mean \pm SEM: 164 ± 7 vs 113 ± 7 , respectively) and higher on day 22 than on day 1 (estimated mean \pm SEM: 167 ± 4 vs

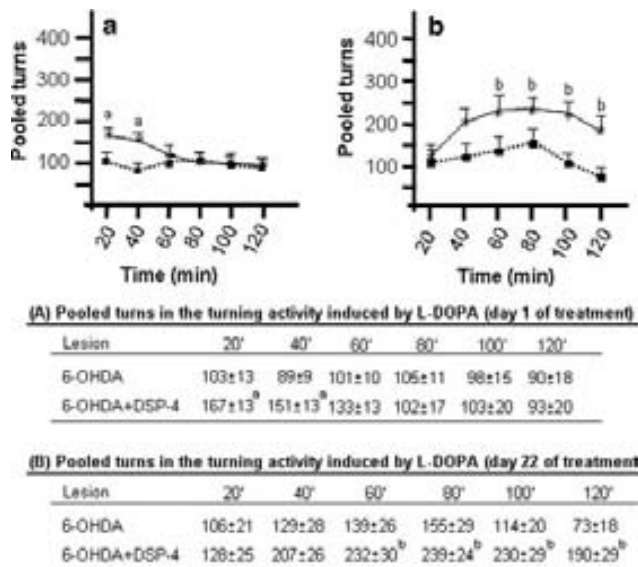


Fig. 2 Pattern of rotation in 6-OHDA (!) and 6-OHDA + DSP-4 (4) lesioned rats observed on days 1 and 22 of chronic L-DOPA treatment (25 mg/kg/day). Pooled turns represent the mean of total contralateral rotations obtained in lapses of 20 min \pm SD. *a* and *b* Significant differences between single- and double-lesioned rats for the same time lapse, on days 1 (**a**) and 22 (**b**)

111 \pm 4, respectively). The time factor showed a significant increase in pooled turns between the 2nd (20–40 min) and 4th intervals (60–80 min) in comparison with the remaining intervals. This was mainly due to the behaviour observed on day 22 ($F_{5,221.449} = 8.452$, $P = 0.005$) because a progressive, non significant decrease was obtained on day 1 ($F_{5,209.615} = 2.060$, $P = 0.72$; Fig. 2a, b).

Pooled turns from the first two 20-min periods of rotation (from 0 to 20 min and from 20 to 40 min) on day 1 of L-DOPA treatment were significantly higher in double-lesioned animals ($P < 0.002$ and $P < 0.005$, respectively), with no significant differences in the following periods of rotation (Fig. 2a). On day 22, pooled turns from 0 to 20 min and from 20 to 40 min were comparable in both groups, but in the following 60 min they were significantly higher in the double-lesioned animals ($P = 0.028$), at 80 min ($P = 0.032$), 100 min ($P < 0.004$) and 120 min ($P = 0.002$) of rotation (Fig. 2b).

Discussion

When left untreated for 7 days after the apomorphine test, our double-denervated animals behaved similarly to single-denervated rats. However, a consistently different pattern of behavioural sensitisation to chronic treatment with L-DOPA emerged between purely dopaminergic- and dopaminergic/noradrenergic-denervated animals. This pattern of response

might resemble that observed in the clinical setting, where dopaminergic sensitisation, once established, does not reverse spontaneously (Hauser et al. 2006). Differences affected the probability to respond, the magnitude of the response, and the time-course of the motor response to each single dose of L-DOPA.

Loss of duration of the motor behavioural effects after 14 days of L-DOPA-treatment was observed in 6-OHDA-lesioned animals, possibly because fluctuations in the stimulation of the dopamine-sensitive receptors could desensitise their activity over time (Thobois et al. 2004). This pattern of response differs from that presented by Parkinson's disease patients whose sensitized response to chronic administration of L-DOPA does not decrease once it is established (Hauser et al. 2007). Unlike the pure dopaminergic denervation model which does not reproduce the course of the disease, the persistence of dopaminergic sensitivity in Parkinson's patients might be due to the progression of the disease, with extension beyond the nigrostriatal dopaminergic system (Lang and Obeso 2004). It is possible that noradrenergic denervation interferes with the function of the basal ganglia networks in different ways.

Systemic L-DOPA administration results in large increases in dopamine levels in the dopamine-depleted striatum while much smaller increases are detected in the dopamine-intact striatum (Abercrombie et al. 1990; Miller and Abercrombie 1999). This non-physiological imbalance in dopaminergic stimulation leads to a complex array of plastic and gene changes in striatal medium spiny neuron function (Arbuthnott et al. 2000; Cenci 2002; Konradi et al. 2004). Furthermore, it contributes to the increasing severity of wearing-off fluctuations as well as to the onset of unpredictable fluctuations (dose-failure episodes) and peak-dose dyskinesias (Centonze et al. 2001; Chase 2004). Current evidence suggests that behavioural sensitisation to the chronic administration of L-DOPA to dopamine-depleted animals involves a plasticity of GABA-mediated signalling in output regions of the basal ganglia (Katz et al. 2005). This effect is accompanied by an increase in the vesicular release of GABA, resulting in sensitization of enhanced extracellular GABA levels in the substantia nigra pars reticulata (Rangel-Barajas et al. 2008).

The significant persistence of the L-DOPA response in our double-denervated animals might indicate that the increase in dopaminergic D₂ receptor density after noradrenergic denervation (Harro et al. 2000) potentiates dopaminergic reduction in the nigrostriatal pathway, thereby enhancing sensitization of the postsynaptic striatal response to dopaminergic stimulation (Ungerstedt 1971). The increase in the dopamine turnover and higher oscillations in the synaptic dopamine concentration (Hauser et al. 2006; Sossi et al. 2007) due to the L-DOPA dosage and

serotonergic activity (Cenci et al. 1998; Picconi et al. 2008) could facilitate the development of abnormal movements similar to dyskinesias (Carta et al. 2007). This is not likely in our study as single dopaminergic lesions caused the death of more than 95% of neurones containing dopamine (Papa et al. 1994).

The modulation of the dopaminergic response that we observed in double-lesioned rats could also be explained by the lack of DSP-4 specificity. It has been reported that DSP-4 modulates serotonin transmission (Fornai et al. 1996; Ross 1976; Srinivasan and Schmidt 2003, 2004) and this could stimulate the dopaminergic-induced turning activity in 6-OHDA-lesioned rats (Srinivasan and Schmidt 2005).

It cannot be ruled out that the regulation of other cerebral nuclei could be relevant in L-DOPA-induced motor activity after the dopaminergic-lesion. Changes in the dopaminergic response in 6-OHDA-lesioned rats could be modulated by noradrenergic innervation (Belujon et al. 2007) and serotonergic activity (Marin et al. 2009) in the subthalamic nucleus.

Alternative explanations for our results could be related to extra-dopaminergic influences in the striatum, as occurs with the progression of Parkinson's disease beyond the nigrostriatal dopaminergic system (Lang and Obeso 2004).

Besides dopaminergic projections from substantia nigra and glutamatergic terminals from the cerebral cortex, striatal spiny neuron dendrites express receptors for other transmitter systems, including serotonergic 5-HT_{2A}-receptors, adenosine A_{2a}-receptors, cannabinoid CB-1-receptors and adrenergic alpha-2-receptors (Hermann et al. 2002; Holmberg et al. 1999; Pompeiano et al. 1994; Svenningsson et al. 1997). Stimulation of these receptors has the potential to modulate the effects of denervation-associated parkinsonism and also those of nonphysiologic dopaminergic receptor stimulation on glutamatergic and GABAergic receptor function and the clinical appearance of motor response complications (Borgkvist et al. 2008; Ferré et al. 2002; Sahin et al. 2007; Zhang et al. 1999). Loss of noradrenergic innervation in Parkinson's disease supposedly worsens disease progression, either by increasing the vulnerability of dopamine-containing neurons (Srinivasan and Schmidt 2004) or by reducing recovery once they are damaged (Fornai et al. 2007; Rommelfanger and Weinschenker 2007). It is conceivable that noradrenergic denervation may contribute to L-DOPA-induced behavioural sensitization by altering spiny neuron function, thereby increasing severity of wearing-off fluctuations and affecting the onset of unpredictable dyskinesias (Obeso et al. 1989). Our experimental model was designed to address the wearing-off phenomenon. We used a single daily L-DOPA dose to obtain pharmacological effects rather than repeated high daily L-DOPA doses that could produce

behaviours comparable to L-DOPA induced peak-dose dyskinesias (Cenci et al. 1998; Marin et al. 2000, 2003, 2005). In contrast with our results, Marin et al. (2008) found that noradrenergic lesions of the *locus coeruleus* by DSP-4 did not modulate the motor activity induced by chronic L-DOPA in 6-OHDA-lesioned rats. Their repetitive daily dopaminergic stimulation by L-DOPA could induce a scenario of sensitization–desensitization of the dopaminergic transmission which would probably differ from that seen in our study, where the L-DOPA dose was greater and administered once a day.

Disruption of noradrenergic transmission might contribute to the pathogenesis and maintenance of abnormal responses to chronic L-DOPA replacement.

Our study has the main limitation of being purely behavioural but our results suggest that noradrenergic depletion plays an important role in modulating the long-term response to L-DOPA. They also provide support for the hypothesis that noradrenergic denervation further potentiates the plastic changes in output regions of the basal ganglia in the dopamine-depleted animal caused by chronic L-DOPA administration.

As well as its role in setting the threshold level for L-DOPA-induced rotational behaviour (Bove et al. 2002), noradrenergic denervation can be involved in reinforcing the development, and particularly the persistence, of behavioural sensitization to repeated L-DOPA treatment. Furthermore, our results raise the possibility that the maladaptive wearing-off and dose-failure responses to chronic L-DOPA treatment in Parkinson's disease may be attenuated by alpha-2 adrenergic receptor inactivation. Beyond its behavioural value, this model of double denervation may also prove useful in studying the molecular and cellular mechanisms of the long-term response to L-DOPA in Parkinson's disease.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS 405/707, FIS 405/429) and Fundación M^a Francisca de Roviralta. The authors wish to thank Manel Pastó (Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona) and Luis Garcia Tato for their excellent technical assistance, and Dr Concepció Marin (Laboratori de Neurologia Experimental, Hospital Clínic, Barcelona) for her insightful input.

References

- Abercrombie ED, Bonatz AE, Zigmond MJ (1990) Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats. *Brain Res* 525:36–44
- Ahlskog JE, Muentner MD (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16:448–458
- Arbutnot GW, Ingham CA, Wickens JR (2000) Dopamine and synaptic plasticity in the neostriatum. *J Anat* 196:587–596

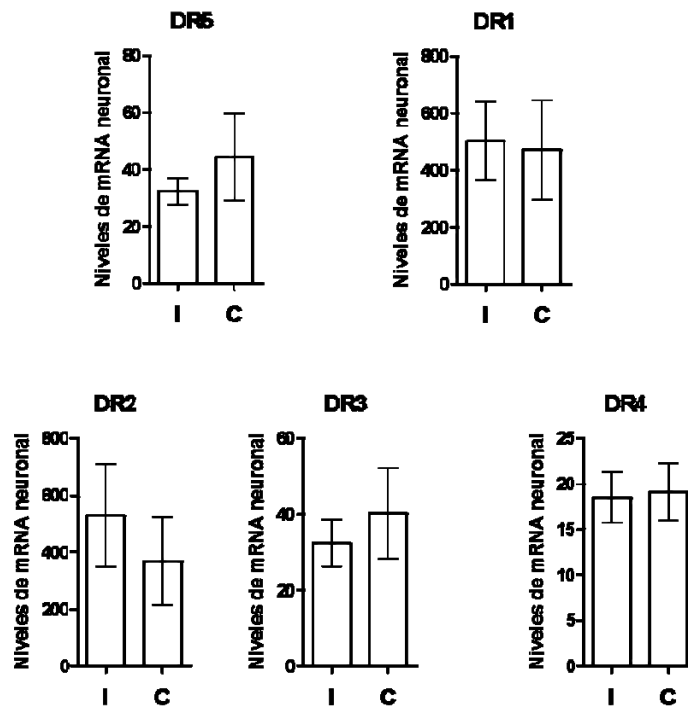
- Belujon P, Bezard E, Taupignon A, Bioulac B, Benazzouz A (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 27:9595–9606
- Borgkvist A, Marcellino D, Fuxe K, Greengard P, Fisone G (2008) Regulation of DARPP-32 phosphorylation by Delta9-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology* 54:31–35
- Bove J, Marin C, Bonastre M, Tolosa E (2002) Adenosine A2A antagonism reverses levodopa-induced motor alterations in hemiparkinsonian rats. *Synapse* 46:251–257
- Carta M, Carlsson T, Kirik D, Björklund A (2007) Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* 130:1819–1833
- Casas M, Prat G, Robledo P, Barbanjo J, Kulisevsky J, Jané F (1999) Scopolamine prevents tolerance to the effects of caffeine on rotational behavior in 6-hydroxydopamine-denervated rats. *Eur J Pharmacol* 366:1–11
- Cenci MA (2002) Transcription factors involved in the pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Amino Acids* 23:105–109
- Cenci MA, Lee CS, Björklund A (1998) L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci* 10:2694–2706
- Centonze D, Picconi B, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P (2001) Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *Eur J Neurosci* 13:1071–1077 (review)
- Chase TN (2004) Striatal plasticity and extrapyramidal motor dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord* 10:305–313 (review)
- Chase TN, Oh JD (2000) Striatal mechanisms and pathogenesis of parkinsonian signs and motor complications. *Ann Neurol* 47:S122–S130
- Fabbrini G, Brochie JM, Grandas F, Nomoto M, Goetz CG (2007) Levodopa-induced dyskinesias. *Mov Disord* 22:1379–1389
- Ferré S, Karcz-Kubicha M, Hope BT, Popoli P, Burgueño J, Gutiérrez MA, Casadó V, Fuxe K, Goldberg SR, Lluís C, Franco R, Ciruela F (2002) Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11940–11945
- Fornai F, Bassi L, Torracca MT, Scalori V, Corsini GU (1995) Norepinephrine loss exacerbates methamphetamine-induced striatal dopamine depletion in mice. *Eur J Pharmacol* 283:99–102
- Fornai F, Bassi L, Torracca MT, Alessandri MG, Scalori V, Corsini GU (1996) Region- and neurotransmitter-dependent species and strain differences in DSP-4-induced monoamine depletion in rodents. *Neurodegeneration* 5:241–249
- Fornai F, Giorgi FS, Alessandri MG, Giusiani M, Corsini GU (1999) Effects of pretreatment with N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) on methamphetamine pharmacokinetics and striatal dopamine losses. *J Neurochem* 72:777–784
- Fornai F, di Poggio AB, Pellegrini A, Ruggieri S, Paparelli A (2007) Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics. *Curr Med Chem* 14:2330–2334 (review)
- Fox SH, Henry B, Hill MP, Peggs D, Crossman AR, Brochie JM (2001) Neural mechanisms underlying peak-dose dyskinesia induced by levodopa and apomorphine are distinct: evidence from the effects of the alpha(2) adrenoceptor antagonist idazoxan. *Mov Disord* 16:642–650
- Fritschy JM, Grzanna R (1991) Experimentally-induced neuron loss in the locus coeruleus of adult rats. *Exp Neurol* 111:123–127
- Grondin R, Hadj TA, Doan VD, Ladure P, Bedard PJ (2000) Noradrenoceptor antagonism with idazoxan improves L-DOPA-induced dyskinesias in MPTP monkeys. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 361:181–186
- Harro J, Meriküla A, Lepiku M, Modiri A-R, Rincken A, Oreland L (2000) Lesioning of locus coeruleus projections by DSP-4 neurotoxin treatment: effect on amphetamine-induced hyperlocomotion and dopamine D2 receptor binding in rats. *Pharmacol Toxicol* 86:197–202
- Hauser RA, McDermott MP, Messing S (2006) Factors associated with the development of motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson disease. *Arch Neurol* 63:1756–1760
- Hauser RA, Rascol O, Korczyn AD, Jon Stoessl A, Watts RL, Poewe W, De Deyn PP, Lang AE (2007) Ten-year follow-up of Parkinson's disease patients randomized to initial therapy with ropinirole or levodopa. *Mov Disord* 22:2409–2417
- Hermann H, Marsicano G, Lutz B (2002) Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience* 109:451–460
- Holmberg M, Scheinin M, Kurose H, Miettinen R (1999) Adrenergic alpha2C-receptors reside in rat striatal GABAergic projection neurons: comparison of radioligand binding and immunohistochemistry. *Neuroscience* 93:1323–1333
- Hornykiewicz O, Kish SJ (1987) Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 45:19–34
- Jenner P (2002) Experimental models of Parkinson's disease. In: Ronken E, van Scharrenburg G (eds) *Parkinson's disease*. IOS Press, London, pp 39–50
- Katz J, Nielsen KM, Soghomonian JJ (2005) Comparative effects of acute or chronic administration of levodopa to 6-hydroxydopamine-lesioned rats on the expression of glutamic acid decarboxylase in the neostriatum and GABAA receptors subunits in the substantia nigra, pars reticulata. *Neuroscience* 132:833–842
- Konradi C, Westin JE, Carta M, Eaton ME, Kuter K, Dekundy A, Lundblad M, Cenci MA (2004) Transcriptome analysis in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis* 17:219–236
- Lang AE, Obeso JA (2004) Time to move beyond nigrostriatal dopamine deficiency in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 55:761–765
- Marin C, Jimenez A, Bonastre M, Chase TN, Tolosa E (2000) Non-NMDA receptor-mediated mechanisms are involved in levodopa-induced motor response alterations in Parkinsonian rats. *Synapse* 36:267–274
- Marin C, Bove J, Bonastre M, Tolosa E (2003) Effect of acute and chronic administration of U50, 488, a kappa opioid receptor agonist, in 6-OHDA-lesioned rats chronically treated with levodopa. *Exp Neurol* 183:66–73
- Marin C, Aguilar E, Bonastre M, Tolosa E, Obeso JA (2005) Early administration of entacapone prevents levodopa-induced motor fluctuations in hemiparkinsonian rats. *Exp Neurol* 192:184–193
- Marin C, Aguilar E, Bonastre M (2008) Effect of locus coeruleus denervation on levodopa-induced motor fluctuations in hemiparkinsonian rats. *J Neural Transm* 115:1133–1139
- Marin C, Aguilar E, Rodríguez-Oroz MC, Bartoszyk GD, Obeso JA (2009) Local administration of sarizotan into the subthalamic nucleus attenuates levodopa-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. *Psychopharmacology (Berl)* [Epub ahead of print]
- Miller DW, Abercrombie ED (1999) Role of high-affinity dopamine uptake and impulse activity in the appearance of extracellular dopamine in striatum after administration of exogenous L-DOPA: studies in intact and 6-hydroxydopamine-treated rats. *J Neurochem* 72:1516–1522
- Obeso JA, Grandas F, Vaamonde J, Luquin MR, Artieda J, Lera G, Rodríguez ME, Martínez-Lage JM (1989) Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology* 39(11 Suppl 2):11–19 (review)
- Papa SM, Engber TM, Kask AM, Chase TN (1994) Motor fluctuations in levodopa-treated parkinsonian rats: relation to lesion extent and treatment duration. *Brain Res* 662:69–74
- Pérez V, Unzeta M (2003) PF 9601N [N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxyindolyl) methylamine], a new MAO-B inhibitor, attenuates

- MPTP-induced depletion of striatal dopamine levels in C57/BL6 mice. *Neurochem Int* 42:221–229
- Pérez V, Sosti V, Rubio A, Barbanj M, Rodríguez-Álvarez J, Kulisevsky J (2007) Modulation of the motor response to dopaminergic drugs in a parkinsonian model of combined dopaminergic and noradrenergic degeneration. *Eur J Pharmacol* 576:83–90
- Picconi B, Paillé V, Ghiglieri V, Bagetta V, Barone I, Lindgren HS, Bernardi G, Cenci A, Calabresi P (2008) L-DOPA dosage is critically involved in dyskinesia via loss of synaptic depotentiation. *Neurobiol Dis* 29:327–335
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 23:163–178
- Prat G, Pérez V, Rubio A, Casas M, Unzeta M (2000) The novel type B MAO inhibitor PF9601N enhances the duration of L-DOPA-induced contralateral turning in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *J Neural Transm* 107:409–417
- Rangel-Barajas C, Silva I, García-Ramírez M, Sánchez-Lemus E, Floran L, Aceves J, Erlij D, Florán B (2008) 6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment increase dopamine D1-stimulated [(3)H]-GABA release and [(3)H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 55:704–711
- Rascol O, Arnulf I, Peyro-Saint PH, Brefel-Courbon C, Vidailhet M, Thalamas C, Bonnet AM, Descombes S, Bejjani B, Fabre N, Montastruc JL, Agid Y (2001) Idazoxan, an alpha-2 antagonist, and L-DOPA-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 16:708–713
- Rommelfanger KS, Weinshenker D (2007) Norepinephrine: the redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 74:177–190 (review)
- Ross SB (1976) Long-term effects of N-2-chlorethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine HCl on noradrenergic neurones in the rat brain and heart. *Br J Pharmacol* 58:521–527
- Sahin B, Galdi S, Hendrick J, Greene RW, Snyder GL, Bibb JA (2007) Evaluation of neuronal phosphoproteins as effectors of caffeine and mediators of striatal adenosine A_{2A} receptor signaling. *Brain Res* 1129:1–14
- Savola JM, Hill M, Engstrom M, Merivuori H, Wurster S, McGuire SG, Fox SH, Crossman AR, Brotchie JM (2003) Fipamezole (JP-1730) is a potent alpha₂ adrenergic receptor antagonist that reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 18:872–883
- Sossi V, de la Fuente-Fernández R, Schulzer M, Troiano AR, Ruth TJ, Stoessl AJ (2007) Dopamine transporter relation to dopamine turnover in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann Neurol* 62:468–474
- Srinivasan J, Schmidt WJ (2003) Potentiation of parkinsonian symptoms by depletion of locus coeruleus noradrenaline in 6-hydroxydopamine-induced partial degeneration of substantia nigra in rats. *Eur J Neurosci* 17:2586–2592
- Srinivasan J, Schmidt XJ (2004) Behavioral and neurochemical effects of noradrenergic depletions with DSP-4 in 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 151:191–199
- Srinivasan J, Schmidt WJ (2005) Serotonergic influence on the potentiation of D-amphetamine and apomorphine-induced rotational behavior by the alpha(2)-adrenoceptor antagonist 2-methoxy idazoxan in hemiparkinsonian rats. *J Neural Transm* 112:1223–1236
- Svenningsson P, Le Moine C, Kull B, Sunahara R, Bloch B, Fredholm BB (1997) Cellular expression of adenosine A_{2A} receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas. *Neuroscience* 80:1171–1185
- Thobois S, Vingerhoets F, Fraix V, Xie-Brustolin J, Mollion H, Costes N, Mertens P, Benabid AL, Pollack P, Broussolle E (2004) Role of dopaminergic treatment in dopamine receptor down-regulation in advanced Parkinson disease: a positron emission tomographic study. *Arch Neurol* 61:1705–1709
- Ungerstedt U (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:69–93
- Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol* 60:337–341
- Zhang W, Klimek V, Farley JT, Zhu MY, Ordway GA (1999) Alpha_{2C} adrenoceptors inhibit adenylyl cyclase in mouse striatum: potential activation by dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1286–1292

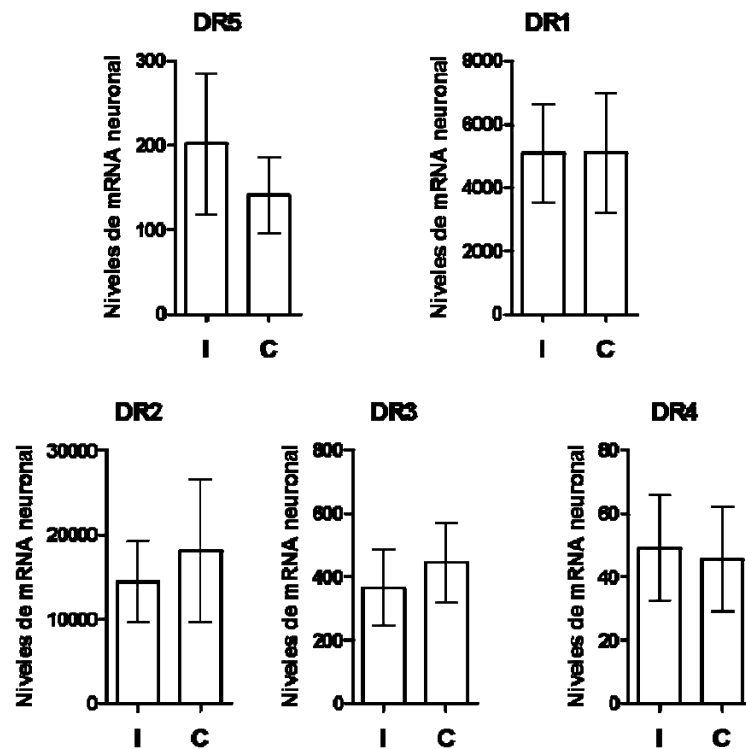
ANEXO III:

*Patrón de expresión de los receptores
dopaminérgicos en la CPF.*

A



B



Se muestra los niveles de mRNA para los cinco subtipos de receptores dopaminérgicos (DrDx) en la CPF de ratas lesionadas con 6-OHDA en (A) previo al tratamiento crónico con L-DOPA y (B) posterior al tratamiento crónico con L-DOPA. Los valores (normalizados con el mRNA de actina y relativizados con mRNA del marcador neuronal Tubb3) son expresados como los niveles del transcrito correspondiente en el hemisferio ipsilateral (I) y en el hemisferio contralateral (C). Se muestra la media \pm SEM, n=7

