

Curso 2012/13
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/2
I.S.B.N.: 978-84-15910-57-2

INGRID MORALES PÉREZ

**Transmisión de volumen en la substantia nigra,
vulnerabilidad dopaminérgica y fisiopatología
de la enfermedad de Parkinson: estudio en animales**

Director
MANUEL RODRÍGUEZ DÍAZ



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A mis padres, Alberto e Irene.

A mis hermanos, Alberto, Yasmina y Alejandro.

A mi pareja, Rubén.

Agradecimientos

En primer lugar, a mi director de Tesis, Dr. Don Manuel Rodríguez Díaz, le agradezco el esfuerzo y el tiempo dedicado a la sabia dirección y a la orientación recibida para la realización de los experimentos que han dado lugar a este trabajo.

Agradecer las becas y contratos recibidos de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias, de Cajacanarias para la realización de tesis y del CIBERNED, por haber hecho posible el desarrollo de la investigación expuesta en la presente memoria.

Mi agradecimiento a todos los compañeros que he tenido en el Laboratorio de Neurobiología y Neurología Experimental, por su apoyo y complicidad a lo largo del tiempo. Especialmente a José Miguel Brito por las nociones en biología celular entre café y café; y a Alberto Sánchez por los prácticos consejos profesionales y los ratos de distensión en el laboratorio. También a Isabel Gómez, a Belén González y a Mari Luz Luis por compartir sus preciosos consejos, saber hacer, constancia y por supuesto su incalculable amistad. Especial mención a Fina, por su gran trabajo en departamento durante 23 años, por su alegría, por su amistad y por compartir su inmensa sabiduría.

Agradecer a las personas del departamento por hacer que me sintiera en casa. Destacar a: Caloli, por su amabilidad y paciencia a la hora de resolver cualquier duda burocrática; a Mireya, por su alegría y los cafés matutinos cargados de energía; a Maica, por los ratos de entretenimiento; y a Araceli, por su fuerza, optimismo y entrega.

A mis padres, Alberto Morales e Irene Pérez, les agradezco profundamente su confianza, su apoyo y su amor incondicional. A mis hermanos, Alberto, Yasmina y Alejandro por interesarse y ofrecerse en cada paso del camino. A Rubén, mi alma gemela, por su infinita paciencia, comprensión y amor, y sobre todo por su gran sentido del humor y su optimismo.

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
GANGLIOS BASALES	1
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	6
Descripción general.....	6
Epidemiología.....	7
Anatomía patológica.....	7
Tratamiento actual y futuro en la enfermedad de Parkinson.....	8
Etiología y patogenia de la enfermedad de Parkinson.....	15
❖ <u>Agentes extrínsecos y vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas</u>	25
❖ <u>El glutamato como agente extrínseco de vulnerabilidad para las neuronas dopaminérgicas</u>	31
<u>OBJETIVOS EXPERIMENTALES GENERALES DE LA PRESENTE MEMORIA</u>	40
<u>MATERIAL Y MÉTODOS: ASPECTOS GENERALES</u>	41
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	41
ANESTESIA Y CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA	41
Anestesia.....	42
Cirugía.....	42
Lesión de las neuronas dopaminérgicas.....	45
MICRODIÁLISIS	45
Tipo de cánula.....	46
Intervalo de adaptación de la cánula.....	49
El medio de perfusión.....	50
Recuperación de la cánula.....	52
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	53
Análisis de aminoácidos por HPLC.....	55
Estudio de catecolaminas por HPLC.....	60
ESTUDIO MORFOLÓGICO	62
Obtención de muestras.....	62
Inmunohistoquímica.....	63
Inmunofluorescencia.....	64
Tinción de Nissl (violeta de cresilo)	66
Densitometría de inervaciones al estriado.....	66
Cuantificación neuronal.....	67

Cuantificación de la reactividad astrocítica.....	68
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69
<u>EXPERIMENTOS: MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN PARCIAL</u>	71
BLOQUE TEMÁTICO 1: EXCITOTOXICIDAD GLUTAMATÉRGICA ESTRIATAL	72
Introducción.....	72
Experimento 1: Efecto inespecífico de la cánula en el estriado.....	73
❖ <u>Metodología</u>	73
❖ <u>Resultados</u>	74
Experimento 2: Acción estriatal del glutamato extracelular extrasináptico.....	77
❖ <u>Metodología</u>	77
❖ <u>Resultados</u>	78
Experimento 3: Acción del glutamato extracelular extrasináptico estriatal sobre el metabolismo glial del glutamato.....	88
❖ <u>Metodología</u>	88
❖ <u>Resultados</u>	89
Discusión Experimentos 1, 2 y 3.....	90
Experimento 4: Excitotoxicidad glutamatérgica estriatal y degeneración retrograda....	94
❖ <u>Metodología</u>	95
❖ <u>Resultados</u>	98
❖ <u>Discusión</u>	108
Experimentos 5 a 8: Interacción estriatal de la dopamina, el glutamato y el ácido ascórbico como mecanismo para la degeneración retrograda.....	112
❖ <u>Metodología común</u>	113
Experimento 5: Efecto del glutamato en la transmisión dopaminérgica estriatal y nigral.....	114
❖ <u>Metodología</u>	114
❖ <u>Resultados</u>	114
Experimento 6: Acción del ácido ascórbico en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica estriatal.....	116
❖ <u>Metodología</u>	116
❖ <u>Resultados</u>	116
Experimento 7: Efecto de la dopaminérgica en la transmisión glutamatérgica estriatal.....	118

❖ <u>Metodología</u>	118
❖ <u>Resultados</u>	118
Experimento 8: Efecto de la levodopa en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica estriatal de ratas denervadas con 6-OHDA.....	119
❖ <u>Metodología</u>	119
❖ <u>Resultados</u>	120
Discusión de los experimentos 5 al 8.....	121
BLOQUE TEMÁTICO 2: REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN GLIAL DE AGENTES NEUROACTIVOS EN LA SUSTANCIA NEGRA	126
Experimento 9: Acción de la hipo-osmolaridad en el reservorio de taurina extracelular extrasináptico de la sustancia negra.....	127
❖ <u>Metodología</u>	127
❖ <u>Resultados</u>	127
Experimento 10: Baja osmolaridad, concentración iónica y taurina extracelular en la sustancia negra.....	128
❖ <u>Metodología</u>	128
❖ <u>Resultados</u>	129
Experimento 11: La respuesta de la taurina a la hipo-osmolaridad depende de las condiciones basales de osmolaridad.....	129
❖ <u>Metodología</u>	129
❖ <u>Resultados</u>	130
Experimento 12: Acción de la hiper-osmolaridad en los niveles de taurina nigral extracelular.....	130
❖ <u>Metodología</u>	130
❖ <u>Resultados</u>	131
Experimento 13: Efecto de la hipo-osmolaridad en el reservorio de glutamato extracelular extrasináptico nigral.....	132
❖ <u>Metodología</u>	132
❖ <u>Resultados</u>	132
Experimento 14: Efecto del bloqueo de los receptores AMPA-Kainato sobre la respuesta de la taurina a los pulsos de hipo-osmolaridad en la sustancia negra.....	133
❖ <u>Metodología</u>	133
❖ <u>Resultados</u>	133
Experimento 15: La respuesta de la taurina a agonistas de los receptores purinérgicos P2.....	134

❖ <u>Metodología</u>	134
❖ <u>Resultados</u>	134
Experimento 16: Participación de agonistas de los receptores purinérgicos P2 en la respuesta de la taurina nigral extracelular extrasináptico a los cambios locales de hipoosmolaridad: acción de pulsos de ATP de corta larga.....	135
❖ <u>Metodología</u>	135
❖ <u>Resultados</u>	135
Experimento 17: Respuesta taurinérgica a la hipo-osmolaridad en presencia de altas concentraciones de ATP en el medio extracelular.....	135
❖ <u>Metodología</u>	135
❖ <u>Resultados</u>	136
Experimento 18: Efecto del antagonista de los receptores purinérgicos P2, piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato (PPADS), en la concentración extracelular de taurina en la sustancia negra.....	136
❖ <u>Metodología</u>	136
❖ <u>Resultados</u>	137
Experimento 19: Efecto del antagonista de los receptores purinérgicos P2 piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato (PPADS) en la respuesta de la taurina a la hipo-osmolaridad.....	137
❖ <u>Metodología</u>	137
❖ <u>Resultados</u>	138
Experimento 20: Efecto de la baja osmolaridad sobre reservorio extracelular no sináptico de glutamato.....	138
❖ <u>Metodología</u>	138
❖ <u>Resultados</u>	139
Experimento 21: Efecto de los receptores purinérgicos P1 en la respuesta del glutamato nigral extracelular extrasináptico.....	139
❖ <u>Metodología</u>	139
❖ <u>Resultados</u>	140
Experimento 22: Efecto de los receptores purinérgicos P2 en la respuesta del glutamato nigral extracelular no sináptico.....	140
❖ <u>Metodología</u>	140
❖ <u>Resultados</u>	141
Experimento 23: Efecto dosis creciente de agonista de la estimulación de receptores purinérgicos P2: adenosina-5'-trifosfato (ATP), en la respuesta del reservorio glutamatérgico nigral extracelular no sináptico a los cambios locales de osmolarida.....	141

❖ <u>Metodología</u>	141
❖ <u>Resultados</u>	142
Experimento 24: Efecto de los antagonistas de los receptores purinérgicos P2: pyridoxalfosfato-6-azofenyl-2',4'-disulfónico (PPADS) en la respuesta del glutamato nigral extracelular extrasináptico a los cambios locales de hipo-osmolaridad.....	142
❖ <u>Metodología</u>	142
❖ <u>Resultados</u>	143
Experimento 25: Acción de los receptores ionotrópicos AMPA/Kainato en la respuesta del glutamato nigral extracelular no sináptico.....	143
❖ <u>Metodología</u>	143
❖ <u>Resultados</u>	144
Experimento 26: Efecto de los receptores ionotrópicos (AMPA/kainato) en la respuesta del glutamato extracelular a los cambios locales de hipo-osmolaridad en la sustancia negra.....	144
❖ <u>Metodología</u>	144
❖ <u>Resultados</u>	145
Discusión experimentos 9-26.....	145
<u>CONCLUSIONES</u>	153
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	155
<u>LISTADOS</u>	215
<u>ABREVIATURAS</u>	215
<u>TABLAS</u>	217
<u>FIGURAS</u>	198
<u>PUBLICACIONES RELACIONADAS</u>	223

INTRODUCCIÓN

El marco general de la presente Memoria es el estudio de los factores involucrados en la etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson (EP). Como se comentará brevemente a lo largo de esta Introducción, se trata de una enfermedad compleja que afecta a distintas poblaciones celulares de los ganglios basales, y cuya génesis involucra mecanismos neurodegenerativos de diversa naturaleza. Primero se realizará una breve descripción de los ganglios basales para la posterior aproximación a algunos aspectos de estos centros que resultan particularmente relevantes para el desarrollo de esta enfermedad. Finalmente la atención recaerá en el marco teórico más directamente asociado a los estudios que aquí se presentan y que involucran al glutamato (GLU) como excitotóxico y a su relación con los astrocitos estriatales en su papel como “agente doble”, esto es, como neuroprotector y como vector potencial de daño neuronal.

GANGLIOS BASALES

El modelo vigente de ganglios basales (GB) fue propuesto en la década de los ochenta (Albin, Young and Penney 1989). En este modelo el estriado es considerado el centro principal de los GB. El estriado ocupa un gran volumen bajo la corteza cerebral de la cual recibe aferencias glutamatérgicas masivas desde todas sus regiones (salvo quizás de la corteza visual primaria). La información procedente de la corteza es procesada en el estriado, desde donde transita por dos rutas de salida relativamente independientes, **la vía directa** (estrio-nigral/pálido medial) y **la vía indirecta**, (estriado-pálido lateral-subtálamo-nigral/pálido medial). Ambas rutas confluyen en los centros de salida de los GB, la sustancia negra (SN) y el pálido medial, desde los cuales la información vuelve a la corteza a través de los núcleos motores del tálamo (Alexander et al. 1986). En estado normal, la activación cortical de la vía directa facilitaría la ejecución de los movimientos seleccionados, mientras que la vía indirecta inhibiría los patrones motores no seleccionados. En este modelo, la dopamina liberada por las neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales genera un efecto dual sobre el estriado, facilitando a través de los receptores D1 la acción de las aferencias corticales glutamatérgicas sobre las neuronas estriatales que conforman la vía directa (neuronas espinosas de tamaño medio de naturaleza GABAérgica) e

inhibiendo a través de los receptores D2 la acción de las aferencias corticales glutamatérgicas sobre las neuronas espinosas de tamaño medio (GABAérgicas) que conforman la vía indirecta. Esta acción moduladora resulta imprescindible para conservar el equilibrio funcional normal de las vías directa e indirecta, equilibrio necesario para una ejecución motora selectiva, precisa y temporal adecuada. Las vías directa e indirecta ejercen una acción moduladora sobre las neuronas GABAérgicas del conjunto SN reticulada / globo pálido que proyectan a los núcleos motores del tálamo. Un exceso de actividad de la vía directa (GABAérgica) desencadenaría una inhibición de las neuronas GABAérgicas de estos centros que proyectan al tálamo. Por el contrario, un exceso de actividad de la vía indirecta (la proyección glutamatérgica subtálamo-nigral) desencadenaría una hiperactivación de las neuronas GABAérgicas del grupo SN reticulada / globo pálido que proyectan al tálamo. Dado que las neuronas tálamo-corticales son glutamatérgicas, un aumento en la actividad de la vía directa se traduce en una hiperactividad de las proyecciones tálamo-corticales, y por tanto un aumento en la actividad de la propia corteza. En cambio, una hiperactividad de la vía indirecta se traduce en una hiperactividad de las neuronas nigro/pálido talámicas (GABAérgicas), seguido de una disminución de la actividad de las proyecciones tálamo-corticales y, en definitiva, en una inhibición de la corteza cerebral.

En la **enfermedad de Parkinson**, la reducción de la acción de la dopamina sobre el estriado altera el equilibrio entre las vías directa e indirecta, provocando un aumento en la actividad de las neuronas de la vía indirecta paralelamente a una disminución en la actividad de la vía directa. El resultado final es el incremento de la actividad del globo pálido interno y la SN reticulada que origina una inhibición sobre las proyecciones glutamatérgicas tálamo-corticales y, por tanto, de la actividad de las áreas corticales involucradas en la respuesta motora. Esta inhibición se ha asociado principalmente a la bradicinesia/hipocinesia que presenta el paciente parkinsoniano. Estas modificaciones funcionales han sido descritas por distintos procedimientos experimentales en animales (Bergman et al. 1994, Vila et al. 1996, Alvarez et al. 2001), y son habitualmente utilizadas para explicar la fisiopatología de los trastornos motores y no motores de la EP (lesión / estimulación del núcleo subtalámico, lesión del pálido medial...).

El modelo de ganglios basales continúa en evolución ya que no explica distintos hechos asociados al tratamiento de estos pacientes y no incluye un número cada vez mayor de datos neuroquímicos, electrofisiológicos y moleculares publicados diariamente en relación a los GB. A continuación se expondrán algunos ejemplos referentes a las limitaciones del modelo actual.

En primer lugar, las **neuronas dopaminérgicas** que degeneran en la enfermedad de Parkinson son mucho más complejas que lo que sugiere el modelo. En su descripción inicial (Dahlstroem y Fuxe 1964, Ungerstedt 1971), estas neuronas se consideraron como una población celular homogénea con el soma localizado en la SN compacta y con proyecciones que sólo inervaban el estriado. Hoy se sabe que otras neuronas dopaminérgicas no nigrales del mesencéfalo también pueden inervar el estriado. Al conjunto de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo que proyectan al estriado se les conoce como sistema dopaminérgico meso-estriatal e incluye también a las neuronas del área retrorubral y del área tegmental ventral. Además, las neuronas dopaminérgicas de la SN envían proyecciones a otros centros como al núcleo subtalámico, a diversos núcleos del tálamo, al globo pálido y a la corteza cerebral (Cossette et al. 1999, Lavoie et al. 1989, Marcusson y Eriksson 1988, Parent y Smith 1987, Prensa et al. 2000, Rommelfanger y Wichmann). La población de neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales dista mucho de ser homogénea. En ella se han observado subpoblaciones celulares diferentes en función de su expresión de calbindina, calretinina y colecistoquinina (Gonzalez-Hernandez y Rodriguez 2000), de la acumulación de melanina (un producto de la auto-oxidación de la dopamina a quinona/semiquinona) (Hirsch et al. 1988, Rescigno et al. 1998, Newcomer et al. 1993) y de la expresión de proteínas asociadas a la sinapsis dopaminérgica (proteína transportadora de dopamina -DAT- y proteína vesicular transportadora de monoamina -VMAT2) (Cruz-Muros et al. 2007a, Cruz-Muros et al. 2007b). Estas diferencias podrían ser la base de la diferente vulnerabilidad observada en las distintas subpoblaciones celulares del sistema dopaminérgico mesoestriatal (Rodriguez et al. 2001b, Damier et al. 1999)

La dopamina puede comportarse como un neurotransmisor clásico con acciones postsinápticas locales (a nanómetros de los lugares sinápticos de liberación) y de corta duración (<20 milisegundos), o como un neuromodulador con acciones de amplia distribución espacial (de micras a milímetros) y de larga duración (de muchos milisegundos a segundos)

(Schultz 1998, Rodriguez et al. 2006). Desde la perspectiva del comportamiento de la dopamina, deberían incorporarse al modelo vigente de ganglios basales factores neuroquímicos como su difusividad por el medio extracelular, como los mecanismos reguladores de su síntesis, liberación y recaptación por las neuronas dopaminérgicas, o como los mecanismos compensatorios postsinápticos (hipersensibilidad de denervación...) (Gonon 1988, Wightman y Zimmerman 1990, Rodriguez et al. 2006).

Durante los últimos años se han venido acumulando nuevos **datos estructurales** que también precisan ser incorporados al modelo de ganglios basales. Un área de especial interés en este sentido es la posible conservación de la **somatotopía** cortical a lo largo del circuito corteza-GB-corteza. Es probable que la información proveniente de distintas regiones corticales o de distintas áreas somatotópicas de una misma región de la corteza transite de forma paralela por los GB (Parent y Hazrati 1995), una posibilidad que apoya la idea de que la información se procese en estos centros de forma paralela y mediante canales independientes (Alexander et al. 1986, Hoover y Strick 1993, Hoover y Strick 1999). Otros autores sugieren en cambio, que una de las características principales de los GB es la capacidad de hacer confluir la información proveniente de centros corticales implicados en funciones diferentes, realizando así una convergencia e integración inter-modal que no puede ser realizada en ninguna otra región del cerebro (Percheron and Filion 1991) y que podría estar alterada en la EP (Filion et al. 1988, Pessiglione et al. 2005, Bergman et al. 1998, Chiken et a. 2008, Vitek et al. 1999).

Otra característica estructural a incluir en el modelo son **los circuitos cortos** que anidan en el interior del gran circuito corteza – estriado – sustancia negra/pálido medial – tálamo – corteza. Este sería el caso del circuito SN – estriado – SN, del circuito estriado – SN– núcleos intralaminares del tálamo – estriado, y del circuito tálamo – corteza – tálamo (Castle et al. 2005)), circuitos que atraen la atención de un número creciente de nuevos grupos de investigación (McHaffie et al. 2005). Otra característica a considerar son las **conexiones inter-hemisféricas** de los GB. Un ejemplo de estas conexiones son las establecidas por las proyecciones cortico-estriatales donde una parte sustancial de ellas se decusan hacia el estriado contralateral (Reiner et al., 2010). Sólo una pequeña parte de la neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales proyectan al estriado contralateral (4%), hecho que no impide que estas neuronas presenten una marcada interacción reguladora inter-hemisférica (Castellano y Rodriguez Diaz 1991, Rodriguez et al. 1990,

Gonzalez-Hernandez et al. 2004). A estos datos estructurales, neuroquímicos y electrofisiológicos habría que añadir otros muchos, algunos de los cuales han sido investigados en nuestro grupo. Este es el caso de la inclusión en el sistema dopaminérgico nigro-estriatal de un porcentaje de **neuronas GABAérgicas** o GABA-Dopérgicas (10-15%) (Rodríguez y Gonzalez-Hernandez 1999, Gonzalez-Hernandez et al. 2001), o la inclusión en el modelo de otros centros que como el núcleo mesencefálico profundo, presentan una interacción con centros de los GB muy similar a la de la sustancia negra o el pálido medial (Rodríguez et al. 2001a, Gonzalez-Hernandez et al. 2002).

Otro factor a considerar son las interneuronas y las células gliales. En el modelo clásico no se suelen atribuir funciones relevantes a las **interneuronas** de los distintos GB, lo cual resulta particularmente inadecuado en centros como el estriado donde las interneuronas denominadas interneuronas GABAérgicas de disparo rápido (“GABAergic fast-spiking interneurons”) (Bracci et al. 2002, Klaus et al. , Koos y Tepper 2002) parecen realizar un importante papel en el procesamiento estriatal de la información proveniente de la corteza cerebral. En los últimos años se han publicado un gran número de evidencias en centros corticales y subcorticales que muestran que **células gliales** como los astrocitos realizan tareas mucho más relevantes que las tareas de soporte previamente atribuidas. Particularmente relevante para el caso de los GB podría ser la regulación astrocítica de la sinapsis glutamatergica en lo que se denomina sinapsis tripartita (neurona presináptica – neurona postsináptica – astrocito con integración perisináptica “en mortaja”) (Overstreet 2005, Araque et al. 1999, Haydon y Carmignoto 2006, Villalba y Smith 2011). Junto a estos astrocitos habría que añadir otras células que como los oligodendrocitos son esenciales para la transmisión de los potenciales de acción y para la comunicación intercelular a distancia. Hay otras células gliales como la microglía que quizás no son tan relevantes para el procesamiento de la información, pero que sin duda, son de gran importancia para la supervivencia de las neuronas y de la glía de los GB (Halliday y Stevens 2011, Teismann y Schulz 2004, Rappold y Tieu 2010, Marcaggi y Attwell 2004). A continuación se describirá brevemente algunos aspectos de la enfermedad de Parkinson que resultan particularmente relevantes para los trabajos experimentales de esta Memoria, descripción que comienza con una breve introducción a la enfermedad.

LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Descripción general

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita inicialmente en 1817 por el médico inglés **James Parkinson** (1755-1824) quien la denominó *Parálisis agitante*. En su monografía de 66 páginas “ An Essay on the shaking palsy”(Parkinson 1817) se describieron como síntomas principales el temblor de reposo, las alteraciones posturales y la deambulación, trastornos que no se acompañaban de alteraciones sensitivas o del intelecto. Esta descripción fue posteriormente ampliada por el neurólogo francés Pierre Marie Charcot a finales del siglo XIX, el cual le dio por primera vez el nombre de enfermedad de Parkinson. La descripción clínica de la EP es un proceso que no ha cesado en la actualidad. Hoy en día, la descripción se centra principalmente en aspectos relacionados con el procesamiento sensorial, emocional y cognitivo) (Lees et al. 2009).

La EP es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SN compacta que proyectan al estriado. Esta degeneración neuronal desencadena una marcada disminución de la concentración de dopamina en el estriado (Jellinger 2001, Kish et al. 1988, Hughes et al. 1992, Hornykiewicz 2006). La muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SN compacta es considerada el indicador principal para el diagnóstico de la EP, aunque la enfermedad curse siempre con alteraciones neurodegenerativas en diversas poblaciones neuronales que abarcan desde el sistema nervioso periférico hasta el bulbo olfatorio. La causa de la degeneración dopaminérgica es desconocida, si bien la opinión mayoritaria en la actualidad considera que es de origen multifactorial. Durante los últimos 10 años se han ido describiendo alteraciones monogénicas capaces de inducir degeneración dopaminérgica. Estas anomalías genéticas junto a otros factores (ej. intoxicaciones...) son capaces de producir un cuadro clínico similar al de la enfermedad de Parkinson, siendo habitualmente referidas de forma genérica como **parkinsonismo secundario**. Entre las causas de parkinsonismo secundario destacan las calcificación de los ganglios basales, las infecciones (encefalitis...), las intoxicaciones (derivados del petróleo, pesticidas -paracuat y rotenona-, manganeso, monóxido de carbono, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina-MPTP-), los traumatismos craneales (síndrome del boxeador), y lesiones estructurales (tumores, isquemia cerebral). Además, existen distintas enfermedades que pueden cursar con trastornos

parkinsonianos como la atrofia multisistémica, la parálisis supranuclear progresiva, el complejo parkinsonismo-demencia-esclerosis lateral amiotrófica, la degeneración ganglionar cortico-basal, la demencia con cuerpos de Lewy, y la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades degenerativas de los GB (Hallervorden-Spatz, Huntington ...). Algunos fármacos, como los neurolépticos que bloquean los receptores de dopamina, también pueden inducir trastornos motores similares a los de la EP, trastornos que en ocasiones pueden persistir de forma permanente tras la retirada del tratamiento (discinesia tardía...). Ninguno de los trastornos motores arriba referidos deben ser confundidos con la EP, enfermedad que presenta un origen desconocido y una incidencia esporádica (**enfermedad de Parkinson primario o idiopático**).

Epidemiología

Las estimaciones más recientes sugieren que más de cuatro millones de personas padecen la enfermedad en el mundo. Con una prevalencia de 1 caso por cada 1000 es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. Su incidencia se incrementa con la edad, alcanzando una prevalencia de más del 3% en la población de más de 65 años. Sólo un 10% de los pacientes parkinsonianos manifiestan la enfermedad antes de los 40 años (FEP, 2000). Aunque hay datos contradictorios, la EP parece afectar por igual a hombres y mujeres, presenta una distribución geográfica uniforme en todo el mundo y no existen diferencias entre las distintas razas. En España hay probablemente más de 150.000 personas que sufren la enfermedad (Fundación Europea para la Enfermedad de Parkinson), número que aumentará con el incremento de la esperanza de vida. Dado su carácter invalidante y crónico, la enfermedad es hoy un grave problema económico, social y sanitario (Gustavsson et al. 2011, Andlin-Sobocki et al. 2005).

Anatomía patológica

Como se comentó anteriormente, la enfermedad de Parkinson cursa con una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN compacta (Braak et al. 2003a, Thannickalet al. 2007, Ehringer y Hornykiewicz 1960), degeneración que resulta macroscópicamente visible como **despigmentación**

de la sustancia negra (las neuronas dopaminérgicas en el hombre producen cantidades elevadas de neuromelanina que da a la SN un característico color oscuro, y de ahí su nombre) (Ehringer y Hornykiewicz 1960). El inicio de los síntomas motores se hace evidente cuando la degeneración afecta a más del 50% de las neuronas dopaminérgicas (Zigmond et al. 1990), circunstancia que ya hace imposible que los mecanismos de adaptación de la sinapsis dopaminérgica puedan impedir la aparición de anomalías funcionales y de trastornos motores. Esta degeneración se acompaña de distintas modificaciones gliales, así como de alteraciones en poblaciones neuronales no dopaminérgicas (Jellinger 1991, Bosboom et al. 2004, Remy et al. 2005, Rodríguez-Oroz et al. 2009) como el locus coeruleus (noradrenérgico) y el núcleo dorsal del rafe (serotonérgico), el núcleo basal de Meynert (colinérgico), el núcleo pedúnculo pontino (glutamatérgico/nitrinérgico) y de otros núcleos corticales, subcorticales y periféricos (corteza premotora, bulbo olfatorio, hipotálamo, sistema entérico ...).

Durante el proceso neurodegenerativo las células dopaminérgicas presentan los denominados cuerpos de Lewy (Lewy 1912), **inclusiones citoplasmáticas** eosinófilas y redondeadas cuyo principal componente es la proteína α -sinucleína (Irizarry et al. 1998, Spillantini et al. 1997). Aunque no son patognomónicos de la enfermedad (puesto que también aparecen en necropsias de ancianos sanos y en patologías como la enfermedad de Alzheimer o la demencia por cuerpos de Lewy), la presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas es imprescindible para el reconocimiento anatomopatológico de la EP. No obstante algunos parkinsonismos como los desencadenados por mutaciones genéticas como la parkina (PARK2) pueden no presentar cuerpos de Lewy (Gaig et al. 2009, Takahashi et al. 1994).

Tratamiento actual y futuro en la enfermedad de Parkinson.

En este apartado se realizarán algunos comentarios referidos al tratamiento de la EP cuya dirección final es la de resaltar la intención y la necesidad de pasar definitivamente del control de la expresión sintomática de la enfermedad (que se viene practicando con mucho éxito durante los estadios iniciales de la enfermedad, pero con éxito decreciente en el progreso de la enfermedad) al tratamiento etiopatogénico que permita retrasar la evolución y finalmente prevenir el comienzo de la neurodegeneración en la EP.

Las herramientas utilizadas principalmente en la actualidad para el tratamiento de la EP van dirigidas al **control de la expresión sintomática** de la degeneración dopaminérgica. La mayor parte de los trastornos que presentan estos pacientes están asociados a la disfunción dopaminérgica. Esto no significa que la dopamina esté directamente implicada en las funciones alteradas de estos pacientes. En realidad muchos de los síntomas que se presentan tras el deterioro dopaminérgico pueden ser compensados mediante la práctica de un deterioro añadido (ej. lesión del pálido medial) lo cual evidencia que “déficit dopaminérgico” y “déficit funcional” no son equivalentes. El déficit dopaminérgico puede generar una desregulación global de los GB cuyo resultado final sean los trastornos motores y no motores que caracterizan la enfermedad. Como la “lección de la neurocirugía” enseña, esta desregulación puede ser compensada con notable éxito actuando sobre otros centros y otros neurotransmisores y sin que el déficit dopaminérgico aminore de forma significativa. No obstante, la compensación del déficit dopaminérgico sigue siendo la herramienta principal para el tratamiento de estos pacientes (Schrag et al. 2007).

Entre los **tratamientos farmacológicos** más habituales dirigidos a compensar el déficit dopaminérgico destaca la levodopa (L-3,4 dihidroxifenilalanina), aminoácido neutro precursor de la dopamina y fármaco principal y más eficaz para el tratamiento sintomático prolongado de la EP. Este tratamiento se administra siempre conjuntamente con un inhibidor de la DOPA-decarboxilasa periférica (carbidopa, benseracida...) que permite reducir su metabolización periférica incrementando sus efectos centrales y previniendo sus posibles acciones colaterales periféricas. La levodopa puede ser complementada (o sustituida) por la administración de agonistas de los receptores de dopamina como apomorfina, bromocriptina, cabergolina, lisuride, pergolide, pramipexol, rotigotina, etc. La tendencia actual es la de utilizar estos fármacos como primera elección para el tratamiento de la enfermedad en sus primeros estadios reduciendo la probabilidad de desarrollar complicaciones motoras severas que acompañan habitualmente al paciente en estadios posteriores de la enfermedad (ej. discinesias). También se utilizan como tratamiento complementario para reducir las fluctuaciones de la respuesta terapéutica a la levodopa (Barbanj et al. 2001, Kieburtz 2008, Yamamoto y Schapira 2008). De uso menos generalizado, pero también esenciales para muchos pacientes, son los fármacos destinados a inhibir la metabolización enzimática de la dopamina y prolongar su acción terapéutica.

Entre estos están principalmente los inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO): selegilina, rasagilina... (Perez-Lloret y Rascol 2011) y los inhibidores de la catecol-o-metil transferasa (COMT): entacapona (Kurth and Adler 1998, Ruottinen and Rinne 1998, Martinez-Martin and O'Brien 1998, Rinne et al. 1998). Al arsenal destinado al control farmacológico de la transmisión dopaminérgica se añaden en la actualidad otros fármacos capaces de actuar sobre otros neurotransmisores de los GB. Este es el caso de los antagonistas de los receptores NMDA de glutamato (amantadina) y los antagonistas de receptores A2a de adenosina o la cafeína (antagonista A1 y A2a) (Bata-Garcia et al. 2010, Gongora-Alfaro 2010).

Hasta bien entrados los años sesenta, no era posible controlar la expresión sintomática de la EP de forma mínimamente eficiente. Fue en esa década cuando se descubre que la enfermedad cursa con un déficit dopaminérgico y que su corrección farmacológica produce espectaculares efectos en la expresión sintomática de la enfermedad. Hasta ese momento, el paciente sufría tras su diagnóstico un deterioro severo y progresivo de funciones motoras básicas y una reducción de su expectativa de vida a 4-6 años. Con la introducción de la levodopa, y especialmente tras la optimización de su cinética de acción con inhibidores de la metabolización de la dopamina, la calidad de vida de los pacientes mejoró de forma espectacular, y su expectativa de vida pasó de forma progresiva a ser similar a la del sector de edad correspondiente en la población normal. No obstante, aun bajo los efectos de los “compensadores sintomáticos” la enfermedad sigue su curso normal, lo que determina que las dosis farmacológicas deban ser incrementadas y que los factores reguladores endógenos (compensación sináptica de excesos y defectos de la neurotransmisión) desaparezcan. En estas condiciones, los pacientes más evolucionados comienzan a presentar complicaciones motoras y no motoras que son cada vez más invalidantes y que terminan por deteriorar severamente la calidad de vida de estos pacientes. Con el objetivo de corregir la expresión sintomática de estos pacientes más evolucionados (y a la sombra del modelo de GB comentado al inicio de esta introducción) comenzaron a introducirse nuevas técnicas destinadas a compensar el déficit dopaminérgico, principalmente mediante implante de células capaces de liberar dopamina (células cromafines de la médula suprarrenal o los neuroblastos fetales que se diferencian a neuronas dopaminérgicas tras su implante cerebral) o corrigiendo la desregulación de los GB secundaria al déficit dopaminérgico sobre todo mediante lesiones de

distintos centros talámicos, del pálido medial y más recientemente del núcleo subtalámico o bien mediante la estimulación crónica profunda del núcleo subtalámico. Los **tratamientos quirúrgicos** destinados a la compensación del déficit dopaminérgico generaron grandes expectativas que posteriormente decayeron por los escasos resultados terapéuticos obtenidos y los graves efectos colaterales que podían acompañarse (discinesias, alteraciones psiquiátricas...). El primer tratamiento quirúrgico efectivo destinado a corregir la desregulación secundaria de los GB fue la talamotomía, la cual resultaba principalmente eficiente en el control del temblor de reposo. Posteriormente se mejoró la triada sintomática esencial de la enfermedad con la lesión del pálido medial, aunque esta intervención sólo era practicable de forma unilateral. Recientemente con la subtalamotomía también se han obtenido resultados muy claros en el control de la triada sintomática de la enfermedad, con la ventaja de que la cirugía es aplicable de forma bilateral. Entre los tratamientos por estimulación se encuentran: la estimulación talámica con efectos similares a la talamotomía y con la ventaja de que puede modularse a lo largo del tiempo; la estimulación del pálido interno (Kumar et al. 2000) (con mejoría prolongada de las discinesias) y la estimulación del subtálamo (Rodríguez-Oroz et al. 2000), tratamiento quirúrgico más usado en la actualidad y que permite reducir la administración de fármacos y la correspondiente aparición de complicaciones farmacológicas.

La suma de los tratamientos farmacológicos y quirúrgicos facilita hoy un control sintomático que a la mayor parte de los pacientes les supone una mejora muy marcada de su calidad de vida durante la primera década de la evolución de la enfermedad. Este control se mejora ostensiblemente con la aplicación de diversos tratamientos rehabilitadores destinados a prevenir la aparición de las complicaciones secundarias causadas en muchas ocasiones más por el uso inadecuado de diversos sistemas, como consecuencia del padecimiento crónico de los trastornos motores propios de la enfermedad, que por la propia enfermedad. Este sería el caso de las alteraciones de la excursión articular como consecuencia del padecimiento crónico de hipertonia e hipocinesia, una reducción que puede desencadenar déficit e incapacidades diversas como alteraciones en la deglución y la fonación (por ante-versión forzada e irreductible del cuello), trastornos de la marcha y caídas (desplazamiento del centro de gravedad asociada a la cifosis), alteraciones respiratorias (hipoventilación con insuficiencia pulmonar obstructiva y restrictiva causada por problemas en la columna cervico-dorsal y en la parrilla

costal), etc. (Sabate et al. 1996a, Sabate et al. 2008, Sabate et al. 1996b). La aplicación sistemática de un **tratamiento rehabilitador** adecuado permite reducir y retrasar la aparición de estas y otras complicaciones secundarias que con frecuencia suponen una merma en la calidad de vida del paciente difícilmente reversible. A esta acción general de la rehabilitación hay que sumar acciones más específicas como las destinadas a mejorar el equilibrio (Alonso-Frech et al. 2011), a disminuir las alteraciones de la marcha y el lenguaje (Ransmayr 2011), y a facilitar las actividades de la vida diaria (Yousefi et al. 2009, Marchant et al. 2010, Sabate et al. 2008).

Incluso cuando todo el control sintomático posible (tratamiento médico + quirúrgico + rehabilitador) se practica de forma óptima, la enfermedad sigue su curso afectando a poblaciones neuronales no dopaminérgicas de la corteza y de distintas regiones subcorticales. Esta progresión se acompaña normalmente de signos y síntomas muy diversos que no responden al tratamiento sintomático y que abarcan un amplio espectro; desde alteraciones motoras complejas como los trastornos de la marcha hasta trastornos de las funciones superiores incluida la demencia. Además, el tratamiento farmacológico prolongado termina produciendo efectos colaterales que también son difícilmente controlables (conducta compulsiva...). Por ello los pacientes terminan sufriendo en estos estadios avanzados de la enfermedad una merma intolerable de su calidad de vida. Dado que en estas condiciones evolucionadas de la EP el control sintomático no resulta ya factible, el interés investigador actual se está desplazando desde el control de la expresión sintomática de la enfermedad hacia el control de la progresión del trastorno neurodegenerativo, es decir, desde los tratamientos sintomáticos al desarrollo de **tratamientos etiopatogénicos**.

En las últimas dos décadas se han encontrado distintas proteínas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) que en animales reducen la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a la acción tóxica de diversos agente (Levivier et al. 1995, Gash, Zhang and Gerhardt 1998). Los ensayos realizados en pacientes no han ofrecido los mismos resultados positivos (Costa et al. 2001, Zurn, Widmer y Aebischer 2001, Grondin et al. 2002). Su naturaleza proteica supone una merma marcada para su uso potencial en clínica. Las proteínas son degradadas en el tracto digestivo (inútiles por vía oral), no atraviesan la barrera hematoencefálica (inútiles por vía parenteral), y son degradadas rápidamente por proteasas del medio extracelular (lo que limita marcadamente

su difusión y su vida media útil) al ser administradas dentro de la barrera hematoencefálica. Por tanto no resulta extraño que la administración de estos factores neurotróficos no hayan generado los efectos terapéuticos deseables. Una alternativa sería su administración mediante el implante de células manipuladas genéticamente con capacidad para liberar estos factores de forma crónica. Aunque esta estrategia parece más prometedora, una liberación inespecífica podría desencadenar efectos adversos importantes, por lo que las células-vectores de tratamiento deberían situarse en las inmediaciones de las neuronas dopaminérgicas que se pretenden proteger. Este tropismo selectivo aún no ha sido alcanzado de forma eficiente. Además, las células-vectores deberían permanecer en el tejido a proteger durante toda la vida del paciente, circunstancia que no ocurre ni siquiera con las células gliales propias del paciente. Una alternativa a esta limitación es la práctica de implantes repetidos, circunstancia no factible en el caso del cerebro. Otra alternativa sería la administración periférica (sangre) de células-vectores con capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y dirigirse a las regiones donde degeneran las células dopaminérgicas, liberando allí los factores neurotróficos. No obstante, incluso en el caso de que las dificultades de tropismo selectivo y de control de la expresión del factor trófico en uso se pudieran alcanzar, restaría por resolver el problema de la sostenibilidad del tratamiento, puesto que al tratarse de una enfermedad vitalicia las células deberían permanecer activas durante toda la vida del paciente. Una posible solución a este problema sería la creación de un “nicho” periférico de células con capacidad para dividirse y liberarse al torrente sanguíneo de forma permanente. Recientemente en nuestro laboratorio se han practicado estudios en la adquisición de un procedimiento que permita la creación de este nicho en el caso de las células madre de la médula ósea (Rodríguez et al. 2007), nicho que se ha confeccionado en la propia medula ósea tras el despoblamiento previo de sus células naturales. Dado que las células modificadas pueden colonizar este nicho permaneciendo en él por un largo periodo y emitir al torrente sanguíneo células que posteriormente puedan acceder al sistema nervioso, éste podría ser un procedimiento posible para la administración crónica de proteínas neuroprotectoras en el sistema nervioso. No obstante, hay un considerable número de problemas por resolver, como la selectividad del tropismo celular, el control de la expresión génica de las células implantadas, la evaluación de la toxicidad relativa a la administración crónica de GDNF, el estudio de la posible toxicidad periférica del GDNF, etc.

Por tanto, el desarrollo de tratamientos etiopatogénicos mediante terapia celular está aún en sus comienzos y su posible utilidad real permanece aún en un futuro a muy largo plazo.

Una alternativa al tratamiento celular es el tratamiento mediante terapia génica. Éste consiste en administrar un vector viral capaz de “implantar” el gen de la proteína neuroprotectora en las células dopaminérgicas en degeneración o en sus células vecinas, y conseguir que el gen se exprese de forma continuada protegiendo a las neuronas no afectas y rescatando a las que ya estén en proceso degenerativo (Brito-Armas et al. 2011, Rodríguez M. et al. (2011). Se han realizado diversos estudios para combatir las enfermedades del sistema nervioso mediante la expresión de proteínas neuroprotectoras muy diversas como el GDNF o la *neurturina* (Kordower et al. 2006, Marks et al. 2008), los cuales han tropezado con diversas dificultades aún presentes en la terapia génica como la duración de la expresión génica, el retro-implante del gen en regiones de los cromosomas donde no altere la expresión de otros genes, los problemas de re-combinación salvaje...(Marks et al. 2010, Bartus et al. 2011). Estas dificultades están presentes también en el uso de la terapia génica para el control de la expresión sintomática de la EP. Este es el caso de la terapia génica destinada a activar la expresión de enzimas específicas como la *DOPAdescarboxilasa* para optimizar la efectividad de la levodopa (Christine et al. 2009, Eberling et al. 2008) o la *ácido glutámico descarboxilasa* en el núcleo subtalámico para facilitar la síntesis de GABA en este centro y reducir la hiperactividad de la vía indirecta en la EP (Kaplitt et al. 2007), o la expresión simultánea de múltiples agentes (ej. *GTP-ciclohidrolasa*, *DOPAdescarboxilasa* y *Tirosina hidroxilasa*) (Palfi 2008, Muramatsu et al. 2002). La terapia génica para el tratamiento sintomático de la EP resulta muy prometedora, pero su posible aplicación clínica está aún en un futuro lejano.

Hay otras posibles alternativas para el tratamiento etiopatogénico de la EP que están siendo ensayadas en modelos animales de la enfermedad y, en algunos casos, en pacientes. Algunos de estos enfoques van dirigidos a evitar la producción (Maruyama et al. 2002) o la acción de los radicales libres (Blum et al. 2001, Zemke y Majid 2004, McCarty 2006). Otros apuntan hacia alguno de los otros mecanismos implicados en la progresión de la degeneración dopaminérgica de los que se hablará con posterioridad. Entre los productos con propiedades anti-radicales o anti-oxidantes que están siendo ensayados en la actualidad destaca el pioglitazone (Bernardo, Levi and

Minghetti 2000, Kim et al. 2002), el calcitriol (Garcion et al. 1998, Garcion et al. 2002, Lefebvre d'Hellencourt et al. 2003), la aspirina y los antiinflamatorios no esteroideos (Minghetti et al. 1997, Swanson et al. 2011), la estatina (Lieberman et al. 2005), la cafeína (Ascherio et al. 2001), el resveratrol (Zhang et al. 2010), la silimarina (Singhal et al. 2011) y el epigallocatechin-3-gallate (EGCG, polifenol del té verde) (Wilson et al. 2003, Jeng et al. 2005, Fujikawa et al. 2005, Jung et al. 2007).

Un problema básico en la evolución de estas nuevas estrategias para el tratamiento etiopatogénico de la EP es el desconocimiento del “peso relativo” de cada factor en el desarrollo y progresión de la degeneración dopaminérgica. Como se verá, muchos de los múltiples factores implicados en el curso degenerativo de las neuronas dopaminérgicas podrían ser secundarios o tener un papel muy indirecto en el devenir de la degeneración, por lo tanto, una tarea esencial a realizar sería la determinación del grado real de importancia de cada factor. Los trabajos realizados para la presente Memoria se centraron en dos de estos factores: la acción del glutamato y el papel de los astrocitos.

Etiología y patogenia de la enfermedad de Parkinson.

La opinión mayoritaria en la actualidad considera que la enfermedad de Parkinson tiene origen **multifactorial** y que su inicio está estrechamente asociado al envejecimiento. A partir de los 20 años de edad, las personas sufren una reducción de entre un 5% y un 6% de las neuronas dopaminérgicas por década (Fearnley y Lees 1991, McGeer et al. 1977). Éste hecho junto a factores genéticos y epigenéticos asociados a la degeneración de las neuronas mesencefálicas nigroestriatales (Jenner y Olanow 1996, Prasad et al. 1999, Dauer et al. 2002), y a mecanismos involucrados directamente en el deterioro de estas células como la disfunción mitocondrial, la incapacidad para la degradación proteica, la inflamación, etc. son responsables del origen y desarrollo de la enfermedad.

Un hecho llamativo en la enfermedad de Parkinson es la diferente **vulnerabilidad** mostrada por las distintas poblaciones dopaminérgicas mesencefálicas. Las neuronas del grupo A9 (sustancia negra) son más vulnerables que las del grupo A8 (campo retrorrúbico) y las A10 (área tegmental ventral, núcleo parabraquial pigmentado, núcleo paranigral, núcleo rostral y caudal lineal, y núcleo interfascicular). En el grupo A9, las neuronas

de la región caudal, lateral y ventral degeneran más precozmente que las localizadas en regiones más rostrales, mediales y dorsales (German et al. 1989, Fearnley y Lees 1991, Damier et al. 1999). Los factores implicados en esta vulnerabilidad diferencial podrían ser tanto de origen intrínseco (internos a las propias neuronas dopaminérgicas) como extrínseco (vinculado a otras células próximas o distales).

Dentro de los **agentes intrínsecos** existen unos factores de resistencia, relacionados con la expresión de proteínas antioxidantes (superóxido dismuta, catalasa, glutatión reductasa), de proteínas fijadoras de calcio intracelular, de receptores de factores neurotróficos o de la coexpresión del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Glazner, Mu and Springer 1998, Yamada et al. 1990, Gonzalez-Hernandez et al. 2001), y otros de vulnerabilidad, asociados a la expresión de receptores de aminoácidos excitatorios (glutamato) e interleuquinas (Difazio et al. 1992, Paquet et al. 1997), al estrés oxidativo (Morrison et al. 1998, Blum et al. 2001) y sobre todo a la propia síntesis y manejo de la DA.

Los agentes **extrínsecos o epigénéticos locales** asociados a la alta vulnerabilidad de la neuronas dopaminérgicas se encuentran en el medio extracelular, próximo a estas células, y son sintetizados y liberados por otras poblaciones neuronales (GABAérgicas, glutamatérgicas, noradrenérgicas) o gliales (astroglía y microglía). Este podría ser el caso de los radicales libres, agentes normalmente vinculados a las mitocondrias de las propias células dopaminérgicas, pero que también son sintetizados en otras células (como las células gliales) desde donde serían liberados dañando a las neuronas dopaminérgicas (Jenner y Olanow 1998, Kohutnicka et al. 1998, Du et al. 2001).

Los agentes **extrínsecos distantes** provienen principalmente de aferencias aminérgicas, colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas. Entre ellas, las aferencias excitatorias glutamatérgicas ocupan un papel destacado. Diferentes trastornos neurológicos, incluyendo la enfermedad de Parkinson, se han vinculado con la acción excitotóxica de este aminoácido (Difazio et al. 1992, Zeevalk et al. 1995, Beal 1998, Sonsalla et al. 1998). La excitotoxicidad del glutamato está asociada a la activación excesiva de sus receptores inotrópicos, especialmente de los receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) cuya activación facilita la entrada de calcio al medio intracelular induciendo anomalías mitocondriales que favorece la producción de radicales

libres, y la activación de la expresión de diferentes enzimas lesivas para la propia neurona (fosfolipasas, proteasas, endonucleasas, óxido nítrico sintasa, etc...). Dado que una parte de los estudios del presente proyecto están relacionados con la excitotoxicidad glutamatérgicas, se volverá a retomar con posterioridad la posible acción tóxica del glutamato de forma más amplia.

Entre los **agentes intrínsecos** concita interés la propia dopamina. La dopamina citosólica puede ser metabolizada por la monoamino-oxidasa o por autooxidación, comportándose en ambos procesos como fuente de especies reactivas de oxígeno. La dopamina se transforma a través de su metabolismo enzimático en 3,4-dihidroxi-phenilacetaldehído y en ácido 3,4-dihidroxi-phenilacético (DOPAC) generando peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno puede ser neutralizado por las enzimas antioxidantes o bien generar en presencia de hierro radicales hidroxilo de alta toxicidad. A pH fisiológico, la dopamina se auto-oxida a quinonas y semi-quinonas reactivas, generando en el proceso aniones superóxido que pueden derivar en la síntesis de peróxido de hidrógeno por la acción de la superóxido dismutasa, o reaccionar con el óxido nítrico originando peroxinitrito (radical altamente tóxico) (Barzilai et al. 2001). Así, el metabolismo de la dopamina genera grandes cantidades de radicales libres que favorecen la oxidación de lípidos y proteínas e inhiben el complejo I mitocondrial (Berman et al. 1996, Spencer et al. 1998), induciendo de esta manera la cascada apoptótica o la muerte neuronal por procesos inflamatorios (Shulman, De Jager y Feany 2011). Por otro lado, las quinonas reactivas pueden oxidarse a aminocromos cíclicos que son posteriormente polimerizados a neuromelanina, o bien interactúan con residuos de cisteína de distintas moléculas a las que inhibe su actividad (Miyazaki and Asanuma 2009). Hay estudios que apoyan la idea de que la dopamina-quinona o algunos de sus productos metabólicos puede inhibir la actividad ubiquitina ligasa de la parkina (LaVoie et al. 2005), la permeabilidad de los poros mitocondriales (Berman and Hastings 1999) y la función proteosómica (Zafar et al. 2006), así como inducir la activación microglial (Kuhn et al. 2006).

La neuromelanina es un polímero complejo resultante del metabolismo de las catecolaminas a quinonas y semiquinonas, siendo particularmente abundante en las células dopaminérgicas de la sustancia negra de los seres humanos a las que confiere su característico color oscuro (Fasano, Bergamasco y Lopiano 2006). La propuesta inicial de que la neuromelanina juegue un papel relevante en la etiopatogenia de la EP tras observar una

correlación positiva entre la concentración de neuromelanina y la degeneración de las células dopaminérgicas (Mann y Yates 1983, Hirsch et al. 1988), fue cuestionada al encontrarse que las células dopaminérgicas de la zona dorsal de la sustancia negra contienen niveles más altos de neuromelanina que los situados más ventralmente (Gibb 1992). Estudios experimentales realizados durante las últimas dos décadas indican que la neuromelanina puede jugar un doble papel, como protector o como agente tóxico (Ben-Shachar et al. 1992, Sulzer et al. 2000). La neuromelanina se puede unir al MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinio), ión activo de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina o MPTP (D'Amato et al. Snyder 1986), y al paracuat, herbicida de gran toxicidad (Lindquist et al. 1988), disminuyendo su acción neurotóxica. Además la neuromelanina puede acumular fármacos dopaminérgicos regulando su concentración intracelular (Salazar et al. 1978), y secuestrar iones redox activos como el hierro reduciendo la formación de radicales hidroxilo (Enochs et al. 1994, Zecca et al. 2003). Sin embargo, la neuromelanina también puede ser fuente de radicales libres y liberar metales tóxicos, acelerando así la muerte celular (Swartz et al. 1992, Shima et al. 1997). Además, su liberación al medio extracelular desde las células degeneradas puede inducir la activación microglial y el proceso degenerativo (Wilms et al. 2003).

La concentración citosólica de dopamina está estrechamente relacionada con dos procesos de transporte por membrana: la captación selectiva de la dopamina extracelular mediante la acción del transportador de membrana celular (DAT), y el almacenamiento en vesículas sinápticas por la acción del transportador de membrana vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) (Horn 1990, Giros y Caron 1993, Uhl et al. 1994). El equilibrio funcional entre estos dos transportadores pueden afectar la vulnerabilidad diferencial de las diferentes subpoblaciones dopaminérgicas del mesencéfalo (Cruz-Muros et al. 2007a). Así, el transportador de membrana celular podría incrementar la vulnerabilidad celular al promover la entrada de dopamina y sus metabolitos al citosol, mientras que el VMAT2 sería un factor neuroprotector al secuestrar la dopamina en vesículas. El hecho de que ratones deficientes en VMAT2 sean más susceptibles a la MPTP que sus homólogos de tipo salvaje (Takahashi et al. 1997), que expresen una tasa espontánea y progresiva de degeneración en células dopamina (Caudle et al. 2007), y síntomas parkinsonianos no motores (Taylor et al. 2009), sugiere que el VMAT2 puede estar también implicado en la degeneración de otras células monoaminérgicas

en la enfermedad de Parkinson. El papel perjudicial del transportador DAT se apoya el hecho de que su expresión e integridad funcional es requerida para hacer a las células dopaminérgicas susceptibles a las neurotoxinas análogas de la dopamina (Kopin 1992, Gainetdinov et al. 1997, Bezard et al. 1999b) y en la existencia de una correlación anatómica entre la distribución de las neuronas dopaminérgicas que expresan altos niveles de ARN mensajero del transportador DAT y la alta vulnerabilidad en la degeneración, tanto en pacientes parkinsonianos como en modelos animales de la enfermedad de parkinson (Cerruti et al. 1993, Hurd et al. 1994, Uhl et al. 1994). Aunque, esta correlación no es aplicable a algunos grupos de células dopaminérgicas (región pigmentada parabraquial en A10) (Shimada et al. 1992, Haber et al. 1995) y su análisis en el mesencéfalo ventral de ratas no ha mostrado diferencias entre ambos patrones de expresión de ARN mensajero (González-Hernández et al., 2004). Sin embargo, el patrón de expresión del DAT glicosilado en el cerebro medio y en el estriado humano muestra un patrón anatómico cercano al de la degeneración dopaminérgica de los pacientes parkinsonianos, relación que se ha confirmado también en modelos de roedor y mono de la enfermedad de Parkinson. (Afonso-Oramas et al. 2009, Missale et al. 1985, Marshall et al. 1990, Cass et al. 1992).

Otra de las características que diferencian a las células dopaminérgicas son los patrones electrofisiológicos que presentan. Estas células muestran patrones de disparo fásico en forma de ráfagas de potenciales de acción con un frecuencia media de 20 Hz provocado por las diferentes aferencias nigrales excitadoras (Schultz 2002, Omelchenko y Sesack 2005), así como patrones de disparo tónico con una frecuencia media de 2- 4 Hz y que se genera en ausencia de las fibras aferentes (Sulzer y Schmitz 2007). Se cree que la actividad tónica “marcapasos” es importante en el mantenimiento de los niveles basales de dopamina en el estriado. La actividad marcapasos está impulsada por las corrientes de calcio generadas por los canales de tipo L presentes en las células dopaminérgicas de la SN compacta. Las células dopaminérgicas del área tegmental ventral poseen también canales de calcio tipo L, pero a diferencia de células de la SN compacta, su marcapasos es generado por los canales de sodio. Mientras que en la mayoría de las células la apertura de los canales de calcio es un evento breve, en las células dopaminérgicas de la SN los canales de calcio se abren en condiciones de relativa hiperpolarización (Striessnig et al. 2006, Chan, Gertler y Surmeier 2009), originando una entrada masiva de calcio al interior

celular. Estas condiciones generan un coste metabólico elevado generado por el bombeo del calcio al espacio extracelular vía membrana plasmática y contra gradiente de concentración. Los dos orgánulos directamente involucrados en el manejo del calcio son la mitocondria y el retículo endoplásmico. El calcio citosólico es secuestrado por transportadores de alta afinidad ATP-dependientes al interior del retículo desde donde se libera al citosol para ser utilizado en funciones moduladoras (Berridge y Stalnaker 2002, Choi et al. 2006) aunque también, puede introducirse en la mitocondria a través de puntos de aposición entre ambos orgánulos (Rizzuto y Pozzan 2006) contribuyendo a la homeostasis del calcio y a la producción de ATP (McCormack et al. 1990). Sin embargo, este sistema retículo endoplasmático mitocondrial puede estar sobrecargado por el uso sostenido de los canales de calcio, por lo que, tanto el agotamiento como el aumento de la concentración de calcio intraluminal en el retículo puede inducir estrés reticular, comprometiendo su acción proteostática (LaFerla 2002, Paschen and Mengesdorf 2005). Por otra parte, la alta demanda de ATP necesaria para mover el calcio al exterior de la célula aumenta la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial llevando apareada la producción de especies reactivas de oxígeno (Sulzer y Schmitz 2007, Chan et al. 2009). La relevancia de la actividad marcapasos de calcio para la vulnerabilidad de las células dopaminérgicas de la SN está apoyada por el hecho de que el bloqueo de los canales de calcio reduce el patrón marcapasos de las células dopaminérgicas maduras de la sustancia negra, protegiéndolas de la acción tóxica de la rotenona y del MPTP (Chan et al., 2009). Los datos disponibles sobre la expresión de calbindina-D28k en la región dorsomedial de la SN compacta y en el área tegmental ventral también apoyan el posible papel del calcio en la vulnerabilidad diferencial de las células dopaminérgicas nigrales (Gerfen et al. 1987b, McRitchie y Halliday 1995, McRitchie et al. 1996, Liang et al. 1996). Esta proteína con capacidad para amortiguar el calcio intracelular se expresa en subpoblaciones de células dopaminérgicas con menor vulnerabilidad (Gerfen et al. 1987b, Yamada et al. 1990, German et al. 1992). Sin embargo, existen evidencias contradictorias en esta hipótesis. No se ha observado diferencias del efecto neurotóxico del MPTP entre las células dopaminérgicas del mesencéfalo de ratones deficientes en calbindina-D28k y las de ratones de tipo salvaje (Airaksinen et al. 1997). Además, las células dopaminérgicas de la región lateral de la SN que expresan calbindina-D28k son más sensibles al efecto neurotóxico de 6-hidroxidopamina que otras

células dopaminérgicas de la SN que no expresan calbindina-D28k (Rodríguez et al., 2001).

Otros agentes intrínsecos de vulnerabilidad que suscitan interés son las mutaciones de genes específicos como causa de degeneración dopaminérgica. Las mutaciones en el gen de la *parkina* (gen PARK2) es la causa más común de parkinsonismo de inicio juvenil (Abbas et al. 1999). La *parkina* es una proteína e3 ligasa de ubiquitina y posee un papel neuroprotector frente a distintos tipos de agresiones como las que conllevan a la agregación proteica (Lo Bianco et al. 2004), al estrés del retículo endoplasmático (Imai et al. 2001), al estrés oxidativo (Kuroda et al. 2006) o al daño mitocondrial (Darios et al. 2003). La *PTEN-quinasa 1 inducida* (gen PINK1) es una serina/treonina quinasa ubicua con capacidad de autofosforilación que interviene en las acciones de distintos estímulos mitocondriales asociados a alteraciones funcionales generales (Mills et al. 2008), a alteraciones en el potencial de membrana (Exner et al. 2007) y al incremento en la producción de radicales de oxígeno (Deng et al. 2005). También interviene en mecanismos asociados a la activación de la apoptosis (Petit et al. 2005). Sus mutaciones causan parkinsonismo hereditario de inicio temprano (Valente et al. 2004). La *DJ-1* (gen PARK7) es una proteína multifuncional con cierta función antioxidante (Kinumi et al. 2004). Las mutaciones en este gen son causa de ciertas formas recesivas infrecuentes de la enfermedad de Parkinson (Bonifati et al. 2003). La *alfa-sinucleína* (α -sinucleína) es una proteína citosólica presináptica cuya relevancia en la enfermedad de parkinson ha sido destacada a partir de su presencia en los cuerpos de Lewy. Su mutación causa enfermedad de parkinson autosómico dominante (Singleton et al. 2003). La α -sinucleína mutada (o sobre expresada) presenta una enorme tendencia a la agregación, formando fibrillas que pasan a generar agregados cada vez mayores (Conway et al. 2000, Fredenburg et al. 2007). Los intermediarios oligoméricos en la formación de estas fibrillas originan poros en las membranas celulares, y particularmente en las membranas mitocondriales, incrementando su permeabilidad. En las células dopaminérgicas, la dopamina citosólica interactúa con la α -sinucleína desacelerando la transformación de oligoméricos intermediarios a fibrillas (Rochet et al. 2004). La sobre-expresión de la proteína puede provocar daño celular con alteraciones del proteosoma, del retículo endoplasmático y la mitocondria (Hsu et al. 2000). El deterioro mitocondrial comprende la oxidación de distintas proteínas asociadas a este orgánulo (Poon et al. 2005),

daños en el ADN mitocondrial y reducción de la actividad del complejo IV (Martin 2006). Se ha descrito un aumento en el nivel de α -sinucleína mitocondrial en las células de la SN de los pacientes con EP (Devi et al. 2008). La mutación de la *proteína LRRK2* (gen Park8) causa un trastorno hereditario autosómico dominante que cursa con trastornos parkinsonianos (lo padecen el 1% de los pacientes con enfermedad de parkinson) (Paisan-Ruiz et al. 2004, Di Fonzo et al. 2005). La toxicidad de varias de sus mutaciones parece estar asociada con el aumento de su actividad quinasa (Gloeckner et al. 2006) y con la activación de la apoptosis por la sobreexpresión de las proteínas LRRK2 (Greggio et al. 2006).

Uno de los factores intrínsecos relacionado con la EP es el estrés oxidativo. Los cerebros de pacientes parkinsonianos presentan claras evidencias de estrés oxidativo que se manifiesta por el aumento de la oxidación de lípidos (Dexter et al. 1989, Montine et al. 2004, Pratico 2001), la alteración en el plegamiento de las proteínas (Stadtman 2001, Salamon et al. 1991), los daños en el ADN nuclear (Salamon et al. 1991, Marnett 2000, Sanchez-Ramos et al. 1987) y mitocondrial (Maruszak et al. 2006), la activación de circunstancias pro-oxidantes mitocondriales (Bindoff et al. 1989, Mizuno et al. 1989, Schapira et al. 1990) y las altas concentraciones de hierro (Jellinger et al. 1993, Lange et al. 1997, Sofic et al. 1991). Estas anomalías se acompañan de una disminución de agentes anti-oxidantes como el glutatión (Murphy y Pearce 1987, Perry y Gordon 1988) y la catalasa (Ambani et al. 1975). También los estudios en modelos animales de EP muestran el estrés oxidativo como un factor esencial en la alta vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas (Peng et al. 2007, Coyle y Puttfarcken 1993, Hepp-Reymond et al. 1999, Grafman et al. 1992). La producción de estrés oxidativo es una de las estrategias utilizadas para generar parkinsonismo en animales (Rodríguez et al. 2001b, Greenamyre et al. 2001, Lapointe et al. 2004, Cilia et al. 2008). Como se ha mencionado anteriormente, la dopamina es un inductor directo de estrés oxidativo debido a la generación de radicales libres tanto por su metabolismo enzimático (Burke et al. 2003, Burke et al. 2004) como por su auto-oxidación espontánea a quinonas (Berman et al. 1996, Spencer et al. 1998), y también por impedir la actividad antioxidante del glutatión al conjugarse con él (Double et al. 2002, Zecca et al. 2002a, Zecca et al. 2002b).

Las mitocondrias son los orgánulos celulares con mayor capacidad para inducir estrés oxidativo. En las mitocondrias se produce el metabolismo

oxidativo energético, la homeostasis del calcio y, en buena parte, el control de la muerte celular (Kroemer y Blomgren 2007, Celsi et al. 2009, Galluzzi, Blomgren y Kroemer 2009). Un metabolismo mitocondrial deficiente genera especies reactivas de oxígeno con consecuencias catastróficas para la célula. Estas circunstancias confieren a la disfunción mitocondrial un papel central en la neurodegeneración parkinsoniana (Schapira y Gegg 2011). La relación entre la disfunción mitocondrial y la degeneración celular dopaminérgica en pacientes parkinsonianos fue descrita por primera vez en 1990 por Schapira y colaboradores. Estos autores observaron en la SN de pacientes parkinsonianos una actividad reducida del complejo mitocondrial I (NADH deshidrogenasa o ubiquinona oxidorreductasa). Esta deficiencia enzimática se confirmó más tarde en la corteza cerebral (Keeney et al. 2006, Parker, Parks y Swerdlow 2008), y en las plaquetas sanguíneas (Krige et al. 1992, Haas et al. 1995, Schapira 2008). El hallazgo en los años 80 de casos de parkinsonismo agudo y persistente en humanos tras la autoadministración intravenosa accidental de MPTP (Langston et al. 1983) apoya la implicación de la disfunción mitocondrial en la enfermedad de parkinson. El MPTP es convertida a MPP+ (metabolito activo) por la actividad de la MAO en células gliales y, tras su liberación al medio extracelular, es captada selectivamente por las células dopaminérgicas mediante el DAT. Una vez en el interior de estas células, el MPP+ desempeña su acción neurotóxica tras inhibir el complejo mitocondrial I (Nicklas et al. 1985, Di Monte et al. 1986a, Mizuno et al. 1988). Este efecto del MPTP ha sido ampliamente utilizado para la creación de modelos animales de enfermedad de Parkinson en ratones y monos (Przedborski y Jackson-Lewis 1998, Blum et al. 2001). La existencia de una relación entre la exposición a las toxinas ambientales, el deterioro de la fosforilación oxidativa y la enfermedad de Parkinson se plantea por la semejanza estructural entre MPP+ y algunos herbicidas como el paracuat. En distintos estudios epidemiológicos se ha observado una asociación entre la incidencia de enfermedad de Parkinson y la exposición a pesticidas (Semchuk et al. 1992, Dhillon et al. 2008, Firestone et al. 2005). El *paracuat* administrado de forma subcrónica en ratones produce degeneración dopaminérgica mesencefálica (Di Monte et al. 1986b, Miller et al. 2007) y acumulación de α -sinucleína. No obstante, el efecto citotóxico del paracuat sobre las mitocondrias parece estar relacionado con el efecto indirecto de la producción citosólica de especies reactivas de oxígeno más que con la inhibición directa del complejo mitocondrial I. Otro pesticida extensamente utilizado para inducir la

enfermedad de Parkinson en modelos animales es la *rotenona* (Sherer et al. 2003, Betarbet et al. 2000, Bove et al. 2005, Cicchetti et al. 2009). Algunos autores sostienen que actúa como una toxina sistémica inespecífica, afectando además de a las neuronas DAérgicas a otras células, incluso periféricas como las del tracto gastrointestinal o hepatocitos (Hoglinger et al. 2003, Lapointe et al. 2004). Aunque, otros autores sugieren que administrada mediante protocolo selectivo, la rotenona sólo produce lesiones en el cerebro y particularmente en neuronas dopaminérgicas a las que puede degenerar después de inducir inclusiones de alfa-sinucleína y de deteriorar el sistema ubiquitina-proteosoma (Cannon et al. 2009, Betarbet et al. 2000). Por su alto grado de lipofilia, la rotenona atraviesa la membrana plasmática y se acumula en diversos orgánulos, ejerciendo su efecto citotóxico sobre las subunidades ND1 y PSSST del complejo I mitocondrial (Schuler y Casida 2001).

Otros factores intrínsecos asociados a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas son las alteraciones de la proteólisis. Todas las células poseen la capacidad de hacer un ajuste fino entre la velocidad de síntesis, maduración y degradación de sus proteínas (Shah y Di Napoli 2007). El retículo endoplasmático es un orgánulo muy relevante en este proceso, interviniendo en el plegamiento (Hosoi y Ozawa 2010), la regulación del proceso de traducción, y la degradación de las proteínas mal plegadas. Las dos vías intracelulares principales de degradación de proteínas son la del sistema ubiquitina-proteosoma, responsable de la mayor parte de la renovación de proteínas citosólicas de corta duración, y la vía lisosomal autofagia que participa en la degradación de proteínas estables de larga duración y en el reciclaje de orgánulos (Jellinger 2009). Durante el envejecimiento, el cáncer o las enfermedades metabólicas y neurodegenerativas, la capacidad para mantener la homeostasis de las proteínas se ve probablemente alterada por el estrés crónico, con lo que las proteínas pueden perder su configuración normal y su actividad, e incrementar su agregabilidad. La inestabilidad estructural de algunas proteínas mutadas o modificadas post-transcripcionalmente las hace particularmente vulnerables a la formación de agregados entre sí y con proteínas normales. Estos agregados de proteína pueden interferir con procesos intracelulares críticos, como la función del sistema ubiquitina-proteosoma, induciendo citotoxicidad directa. Distintas evidencias sugieren una alteración de los mecanismos implicados en el equilibrio de síntesis-degradación de proteínas en la enfermedad de Parkinson. Un ejemplo de ello es la presencia de agregados proteicos que

contienen ubiquitina y α -sinucleína en los cuerpos de Lewy (Braak et al. 2003b). La actividad enzimática y la expresión de las subunidades α del proteosoma y del activador proteosómico PA700 se han encontrado disminuidas en la SN de los pacientes con EP, mientras que en otras regiones cerebrales pueden estar más altas de lo normal, datos que han sugerido que podrían estar implicadas en respuestas compensadoras al estrés proteolítico (McNaught y Jenner 2001, McNaught y Olanow 2003). Incluso en personas sanas, el nivel del activador proteosómico PA28 observado en la SN compacta es más bajo que el observado en otras regiones del cerebro (McNaught et al. 2002, McNaught y Olanow 2003). Además, un estudio inmunohistoquímico reciente mostró que la expresión de PA28 y PA700 es muy baja en la SN compacta de rata normales, y que diferentes estímulos estresantes inducen la sobreexpresión PA28/PA700 en distintas células, pero no en neuronas dopaminérgicas (McNaught et al. 2010). Por lo tanto, es posible que el sistema ubiquitina-proteosoma esté constitutivamente débil en las neuronas dopaminérgicas mesoestriatales, contribuyendo a su especial vulnerabilidad en la enfermedad de Parkinson idiopático.

A pesar de la evidencia inequívoca de la existencia de una alteración de la proteostasis en la patogénesis de la enfermedad, aún no está claro si esta alteración es causa de la degeneración dopaminérgica o consecuencia de que ésta degeneración lenta ya ha comenzado (Harrower et al. 2005).

❖ **Agentes extrínsecos y vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas**

Los agentes extrínsecos más habitualmente considerados son los provenientes de otras poblaciones neuronales con las que las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales establecen alguna interacción. En apartados anteriores hicimos una descripción global de la estructura funcional de los GB. A continuación volveremos a esta descripción para centrarnos en los aspectos más directamente relacionados con la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas desde la perspectiva de las sustancias de origen extrínseco potencialmente tóxicas.

Las **neuronas nigroestriatales** tienen su soma en la SN, estructura ovalada y relativamente plana que se extiende rostrocaudalmente a lo largo de la porción más ventral del mesencéfalo (Heimer et al. 1985, Smith et al. 1990). Se divide en dos porciones citoarquitectónicas, una porción dorsal (**SN compacta**) en forma de lámina delgada con alta densidad neuronal (Kitamura,

Kakimura y Taniguchi 2002, Oorschot 1996) y compuesta mayoritariamente de neuronas *dopaminérgicas* (Parent y Hazrati, 1995a; Redgrave et al., 1992), y otra ventral (SN reticulada) más voluminosa y con forma de ovoide aplanado. Esta región de la SN presenta menor densidad celular y está compuesta mayoritariamente por neuronas GABAérgicas (Conde 1992). Las neuronas dopaminérgicas de la SN compacta son de tamaño mediano ($\approx 20\mu$ en la rata), densamente empaquetadas y de morfología fusiforme o redondeada. Poseen de tres a seis troncos dendríticos principales poco ramificados y tienen un campo dendrítico oval de pocas espinas (Juraska et al. 1977, Tepper et al. 1987) que tiende a quedar localizado dentro de la SN compacta (Castellano y Rodríguez Díaz 1991) con excepción de las más ventrales que envían dendritas verticalmente hacia la SN reticulada. Su axón no mielinizado no emite colaterales dentro de la SN y se origina a partir de una de las dendritas principales desde donde se proyecta de forma relativamente tortuosa hasta alcanzar el estriado. Estas neuronas dopaminérgicas corresponden al grupo A9 de la clasificación de Dahlström y Fuxe (1964) y en algunas especies (mono y el hombre) contienen melanina. La SN compacta contiene una pequeña proporción (18%) de *neuronas GABAérgicas* de tamaño pequeño y forma estrellada, cuyas dendritas no sobrepasan los límites del centro (Gonzalez-Hernandez and Rodríguez 2000). La SN reticulada está constituida por una población heterogénea de *neuronas GABAérgicas* que son en su mayoría de proyección (nigrotalámicas, nigrotectales y nigrotegumentales). Aunque de origen embriológico distinto, por su citoarquitectura, conexiones, neuroquímica y fisiología, la SN reticulada puede ser considerada como una prolongación caudomedial del pálido interno (núcleo entopeduncular en la rata) (Paxinos 1990). En la parte lateral de la SN se distingue una zona constituida tanto por neuronas dopaminérgicas como GABAérgicas, llamada SN lateral y cuyas conexiones difieren ligeramente de las de la SN compacta y de la SN reticular (Fallon et al. 1985)).

La principal fuente de **afereencias nigrales** son de naturaleza *GABAérgicas* (aunque también contienen sustancia P) que proceden de las células espinosas de tamaño medio del estriado (vía directa) y termina preferentemente en las neuronas GABAérgicas de salida de la SN reticulada (Grofova et al. 1982, Somogyi y Smith 1979, Williams y Faull 1985, Fisher et al, 1986, Bolam y Izzo 1988, Bolam y Smith 1990). Esta proyección presenta 3 formas diferentes de organización, una topográfica donde la región medial

del estriado proyecta a la región medial de la SN reticular, la región lateral del estriado a su homónima de la SN reticular, la parte dorsal del estriado proyecta a la ventral de la SN reticular y la ventral del estriado a la dorsal de la SN reticular (Deniau et al. 1992, Deniau et al. 1996, Deniau y Thierry 1997), otra no topográfica en la que los axones de cualquier región estriatal se extienden ampliamente en el eje antero-posterior de la SN reticular formando láminas concéntricas que alcanzan las células de proyección nigrotalámicas, nigrotegumentales y nigrocoliculares (Deniau y Chevalier, 1992; Deniau et al., 1996, Deniau y Thierry, 1997), y otra de organización compartimental en la cual las neuronas de la matriz estriatal proyectan a la SN reticulada y las de los parches a la SN compacta (Gerfen 1984, Gerfen 1985). Otra fuente importante de aferencias *GABAérgicas* a la SN es el pálido externo, el cual envía proyecciones que terminan preferentemente en la SN reticular (Smith y Bolam 1991), pero que también alcanzan a la SN compacta (Smith y Bolam 1989, Smith y Bolam 1990, Hattori et al. 1975). Desde el núcleo entopeduncular (o pálido interno de la rata) se establecen proyecciones a ambas partes de la SN (Hay-Schmidt y Mikkelsen 1992).

La SN también recibe aferencias *glutamatérgicas* masivas desde diferentes centros. El más masivo y relevante para la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson procede del núcleo subtalámico (Rodríguez et al., 1998, Blandini et al. 2000, Obeso et al. 2000). Estas proyecciones ejerce una marcada acción excitadora sobre las neuronas de la SN, y aunque sus efectos se extienden preferentemente sobre las neuronas *GABAérgicas* de la SN reticulada con las que forman sinapsis asimétricas, también actúan directamente, en un 10%, sobre las de la SN compacta (Kanazawa et al. 1976). Las otras aferencias *glutamatérgicas* provienen de la corteza cerebral frontal y prefrontal que terminan mayoritariamente en la parte rostral de la sustancia negra compacta (Kitano et al. 1998), y del núcleo tegmental pedúnculo pontino donde muchas de las neuronas también contienen *óxido nítrico* y *acetil colina* e inervan tanto neuronas dopaminérgicas como *GABAérgicas* (Lavoie y Parent 1994); (Futami et al. 1995), (Scarnati et al. 1984); (Meltzer et al. 1997). Algunas de las proyecciones del núcleo pedúnculo pontino son sólo *colinérgico-nitrinérgicas*, inervando preferentemente la SN compacta (Clarke et al. 1987, Beninato y Spencer 1987, Clavier et al. 1976, Scarnati et al. 1988, Lavoie y Parent 1994, (Gonzalez-Hernandez et al. 1997). La SN también recibe aferencias *serotoninérgicas* de los núcleos del rafe (Bobillier et al. 1976, Cobb y

Abercrombie 2003)), *peptidérgicas* desde el núcleo central de la amígdala y el núcleo de la estria terminal (llegan a la sustancia negra compacta) (Vankova et al. 1992, Fudge y Haber 2001), *dinorfinérgicas* desde el estriado (cotransmitiendo con GABA), hipotálamo y amígdala (Fallon et al., 1985), *taurinérgicas* desde el estriado (García Dopico et al. 2004), así como aferencias desde los núcleos centromediano y parafascicular talámico, cuyo neurotransmisor no ha sido bien identificado (Sadikot et al. 1992).

Las **eferencias** al estriado pueden ser clasificadas en dos subtipos, unas que utilizan dopamina y otras que utilizan glutamato (Rodríguez y González-Hernández 1999). Las neuronas *dopaminérgicas* nigroestriales constituyen el mayor sistema dopaminérgico cerebral, y su degeneración es, como ya se ha comentado en distintas ocasiones, crucial para la aparición de la enfermedad de Parkinson (Jellinger y Paulus 1992, Jellinger 1999). Las proyecciones nigroestriales terminan fundamentalmente sobre dos subpoblaciones de neuronas GABAérgicas estriales de proyección, las de la *vía directa* que expresa el receptor D1, el cotransmisor sustancia P e inervan directamente a la SN reticulada y las de la *vía indirecta* que poseen el receptor D2, cotransmiten con encefalina y proyectan indirectamente a la SN reticulada, a través del pálido lateral y del núcleo subtalámico (Ingham, Hood and Arbuthnott 1991, Kubota et al. 1986). Las terminaciones estriales de las proyecciones dopaminérgicas provenientes de la SN presentan una distribución compartimental (Gerfen et al, 1987b, Gibb, 1992 (Prensa y Parent 2001) y topográfica (Fallon y Moore 1978, Hontanilla et al. 1995). La mayoría de los axones que se originan en la SN compacta dorsal terminan en el estriado dorsal (parches y matriz), los que proceden tanto de la SN compacta dorsal como del área tegmental ventral alcanzan al estriado ventral, y los de la parte ventral de la SN compacta junto con las neuronas dopaminérgicas de la SN compacta envían la mayoría de sus axones a los estriosomas (Gerfen et al, 1987, Gibb, 1992, Prensa y Parent, 2001). Existen proyecciones *dopaminérgicas* desde la SN compacta al pálido externo (Parent, 1986, Druga 1993, Gaykema y Zaborszky 1996) y al núcleo subtalámico (Francois et al. 2000, Prensa et al, 2000), así como a otros centros externos a los ganglios basales tales como el núcleo septal medial y lateral, sustancia innominata, núcleo de la banda diagonal, tubérculo olfatorio, núcleo amigdalino lateral, habénula, cerebelo y corteza parietal, prefrontal, entorrinal y cingular (Kizer et al. 1976). Las proyecciones hacia la corteza cerebral envían colaterales al estriado (Loughlin y Fallon 1984, Takada y

Hattori 1986). Finalmente, se han descrito **proyecciones descendentes dopaminérgicas** desde la sustancia negra al núcleo del trigémino, el locus coeruleus, la región parabraquial, el núcleo del rafe, formación reticulada del bulbo raquídeo e incluso la médula espinal (Copray et al. 1990, Von Krosigk y Smith 1991).

Las eferencias nigrales *GABAérgicas* proyectan principalmente al tálamo, a los colículos y al núcleo pedúnculo pontino. La proyección nigrotalámica es la más abundante y se originan fundamentalmente en la parte rostral y lateral de la SN reticulada (Carpenter et al. 1976), (Parent et al. 1983). La mayor parte de las neuronas de esta proyección se distribuye de forma topográfica por la región magnocelular del núcleo ventral anterior (VA), por la región ventromedial del núcleo ventral lateral (VL) del tálamo, invirtiendo también el núcleo ventromedial (VM), y menos profusamente por el núcleo dorsomedial, el parafascicular y la lámina medular interna (Kha et al. 2001, Sakai y Smith 1992, Clavier et al. 1976). También se ha descrito una proyección directa desde la SN reticulada al complejo pulvinar-lateral posterior en el gato (Saavedra et al. 1987). La proyección nigrocolicular parte de la SN reticulada dorsolateral (Beckstead y Frankfurter 1982) y termina bilateralmente en todos los estratos del colículo superior (aunque de forma más marcada en los estratos intermedios del colículo ipsilateral) (May y Hall 1986, Redgrave et al. 1992). Sus colaterales llegan a la formación reticular parvocelular del puente y del bulbo raquídeo (Yasui et al. 1994, Yasui et al. 1995). La proyección nigrotegmenal alcanza el núcleo pedúnculo pontino del segmento bilateralmente (Spann y Grofova 1991), haciendo sinapsis principalmente con neuronas glutamatérgicas y colinérgicas, algunas de las cuales proyectan de vuelta hacia la SN (Grofova y Zhou 1998), mientras que otras envían axones descendentes a la formación reticular del bulbo (Nakamura et al. 1989).

Como ya se comentó, **el estriado** es el principal centro integrador de la información en los ganglios basales. A partir de los estudios con marcadores para la acetilcolinesterasa, el estriado se ha subdividido en dos partes, el estriado dorsal y el estriado ventral (Parent, 1986). El estriado dorsal o neostriado lo conforman dos núcleos histológicamente idénticos, el caudado y el putamen, recibe aferencias de todas las cortezas cerebrales (Parent, 1986, Alheid et al. 1990, Mena y García 1990), y se encuentra compartimentado según criterios neuroquímicos en estriosoma y matriz (Graybiel y Ragsdale 1978). Los *estriosomas* son pobres en

acetilcolinesterasa y disponen de una alta actividad tirosina hidroxilasa (TH), gran densidad de opiáceos, de receptores opiáceos μ , de receptores muscarínicos M1 y de receptores dopaminérgicos D1 (Mena y Garcia 1990), recibiendo proyecciones glutamatérgicas de la corteza prefrontal, prelímbica, límbica y de la amígdala basolateral. La **matriz** es rica en actividad acetilcolinesterasa, dispone de alta densidad de receptores muscarínicos M2 y dopaminérgicos D2, y de baja densidad de receptores opiáceos μ y kappa (Mena y Garcia 1990). Recibe aferencias glutamatérgicas procedentes fundamentalmente de la corteza frontal, parietal y occipital, y en menor medida de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, del área retrorrubral y de la parte dorsal de la SN compacta (Mena y García 1990, Gerfen et al. 1987b, Gerfen et al. 1987a). El estriado ventral está constituido por el núcleo accumbens, la parte ventromedial de los núcleos caudado y putamen y una extensa parte del tubérculo olfatorio. Está conectado con el sistema límbico, la formación hipocampal y el área tegmental ventral, y sus funciones están más relacionadas con aspectos emocionales de la conducta (Helmer y Britt 1985, Mena y Garcia, 1990).

Las **neuronas estriatales** pueden ser clasificadas como neuronas con espinas y sin espinas. Las neuronas con espinas son las más numerosas, y pueden ser de dos tipos: espinosas tipo I y espinosas tipo II. Las espinosas tipo I o neuronas espinosas de tamaño medio, GABAérgicas y de proyección, constituyen el 96% de la población total de neuronas del estriado (Kemp y Powell 1971). Las espinosas tipo II, colinérgicas e intrínsecas, representan sólo el 1% del total (DiFiglia et al. 1976). El 3% restante está representado por las células sin espinas, intrínsecas o interneuronas que pueden ser de tres tipos: I, II y III.

La naturaleza química de las **aferencias estriatales** son principalmente *glutamatérgicas* de proyecciones de la corteza cerebral y los núcleos intralaminares del tálamo; *dopaminérgicas* procedentes de la SN compacta y otros centros mesencefálicos; *serotoninérgicas* que llegan procedentes del núcleo dorsal del rafe y *noradrenérgicas* procedentes del locus coeruleus (Parent 1986).

Las **aferencias estriatales** son *GABAérgicas* que proyectan al pálido lateral (cotransmisión con encefalina), al pálido medial (n. entopeduncular en la rata) y a la SN reticular (cotransmisión con sustancia P y dinorfina) y *taurinérgicas* que proyectan a la SN (Graybiel, 1990; (Reiner and Anderson

1990). Además, algunas evidencias sugieren la existencia de una vía estriatonigral excitatoria que afecta a un 15% de neuronas de la SN reticular (neuronas nigropedunculares y nigrotalámicas) (Rodríguez et al., 2000). Finalmente, algunas proyecciones estriatales descienden para dirigirse a distintos núcleos troncoencefálicos, al núcleo mesencefálico profundo (Gonzalez-Hernandez y Rodríguez 2000), a la habénula lateral y al colículo superior (Albin et al., 1989).

❖ El glutamato como agente extrínseco de vulnerabilidad para las neuronas dopaminérgicas

Uno de los agentes extrínsecos de vulnerabilidad dopaminérgica que en la actualidad reúne mayor interés es el glutamato. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro de los mamíferos, donde también puede comportarse como neurotóxico. Los niveles de glutamato extracelular son regulados por transportadores neuronales y gliales. Una vez recaptado, el glutamato es metabolizado en los astrocitos por la glutamina sintetasa, evitando así que la concentración extracelular de glutamato alcance niveles neurotóxicos (Plaitakis y Shashidharan 2000, Dervan et al. 2004). Las **acciones glutamatérgicas** se ejercen a través de dos familias de receptores glutamatérgicos, los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos realizan su función a través de la activación de canales iónicos a los cuales se encuentran asociados. Estos receptores son el N-metil-D-aspartato (NMDA), el α -amino-3-hidroxi-5-ácido metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), y el kainato (KA) (Burnashev et al. 1992, Hollmann y Heinemann 1994). Los receptores metabotrópicos están acoplados por proteínas G a diferentes sistemas de segundo mensajero, y se subdividen en diferentes grupos: I, II y III (Conn y Pin 1997).

El **glutamato extracelular** posee 2 orígenes diferentes, la reserva neuronal dependiente del calcio, y la reserva glial que es, en gran medida, calcio independiente. En condiciones basales, el glutamato glial es el 60% del total del glutamato extracelular extrasináptico (Xue et al. 1996, Baker et al. 2002, Cavelier y Attwell 2005). A pesar de la posible relevancia del glutamato glial como excitotóxico, el estudio del glutamato en los GB se ha centrado principalmente en el glutamato neuronal.

La **interacción del glutamato** neuronal con las neuronas dopaminérgicas se realiza tanto en la sustancia negra como en el estriado. Las

principales aferencias glutamatérgicas a la sustancia negra vienen del *núcleo tegmental pedúnculo pontino* y del *núcleo subtalámico* (Iribe et al. 1999). Estudios hodológico y de microscopía electrónica indican que la mayor parte de las aferencias provenientes del núcleo subtalámico que llegan a la sustancia negra alcanzan a las neuronas GABAérgicas de la SN reticulada formando sinapsis asimétricas y que sólo un 10% de las terminaciones glutamatérgicas hacen contacto con neuronas dopaminérgicas (Kita y Kitai 1987). Así que en función de la célula diana y el tipo de receptor, el glutamato puede actuar directamente excitando las células dopaminérgicas a través de receptores ionotrópicos o inhibiéndolas al estimular receptores metabotrópicos o bien puede inhibirlas indirectamente tras facilitar la liberación de GABA desde la neuronas GABAérgicas de la SN reticulada (Lee y Tepper 2009). La transmisión glutamatérgicas al estriado presenta también una intensa interacción con la transmisión dopaminérgica nigro-estriatal. Las principales vías de entrada al estriado son las glutamatérgicas provenientes de la *corteza cerebral* y del *tálamo*, y las DAérgicas provenientes del mesencéfalo. Las aferencias dopaminérgicas generalmente modulan la acción de las aferencias glutamatérgicas sobre las neuronas espinosas de tamaño medio que conforman las vías directa e indirecta de salida del estriado. En general, la **dopamina inhibe la liberación de GLU**, mientras que el GLU extracelular facilita la liberación de ácido ascórbico (en el estriado existe un contra-transporte de membrana mediante el cual la recaptación del GLU liberado se acompaña de una liberación de ácido ascórbico), incrementando con ello la vida media extracelular y la acción de la dopamina. En la sección Experimentos destinada a introducir y comentar los estudios de esta Memoria se retomarán con más detalle algunos aspectos relativos a la interacción DA-GLU-ácido ascórbico que serán particularmente esenciales para este trabajo.

La acción excitotóxica del glutamato ha sido considerada como causa de degeneración neuronal (Lucas y Newhouse 1957) en trastornos tan diversos como la isquemia cerebral, la epilepsia, los traumatismos craneoencefálicos o las enfermedades neurodegenerativas. En el caso de la EP, el mecanismo más frecuentemente por el que se induce la **excitotoxicidad glutamatérgica** es la hiperactividad de las neuronas glutamatérgicas subtálamo-nigrales secundaria a la reducción parcial de neuronas DAérgicas nigroestriatales (Hutchison et al. 1998, Rodríguez-Oroz et al. 2001, Bezard et al. 1999a, Obeso et al. 2004, Bergman et al. 1994, Hassani et al. 1996). La secuencia esquematizada de los acontecimientos propuestos sería:

Inicio de la degeneración DAérgica (por envejecimiento u otras causas) originando una disminución en la liberación de la DA estriatal y por tanto una reducción en la actividad de los receptores D2 de las neuronas espinosas de tamaño medio que conforman la vía indirecta. El incremento en la transmisión GABAérgica estrio-palidal (inhibida por los receptores D2 en condiciones normales) generaría una menor actividad en la transmisión GABAérgica pálido-subtalámica ocasionando un aumento de la actividad GLUérgica subtálamonigral. El aumento del glutamato extracelular en la SN y de la actividad de los receptores GLUérgicos en las dendritas y el soma de las neuronas DAérgicas se traduce en un incremento del Ca^{2+} intracelular (introducido por la estimulación de los receptores ionotrópicos de glutamato o por la liberación desde reservorios intracelulares tras la estimulación de receptores metabotrópicos de GLU) que aumentaría la actividad de enzimas Ca^{2+} -dependientes (fosfolipasas, proteasas, endonucleasas...) causando desajustes metabólicos en el soma de las neuronas DAérgicas nigroestriatales y por tanto su degeneración por excitotoxicidad (Chen et al. 1999, Schousboe et al. 1993)

La hipótesis excitotóxica se apoya en distintas **evidencias experimentales** en animales. Así, el bloqueo de los receptores NMDA reduce la vulnerabilidad DAérgica a tóxicos como el MPTP o la 6-OHDA (Facchini et al. 2002, Hazell et al. 1997, Turski et al. 1991, Zuddas et al. 1992). Un efecto neuroprotector similar se induce al facilitar la recaptación del GLU extracelular (Hu et al. 2005, Sheldon and Robinson 2007), o al lesionar el núcleo subtalámico (Carvalho y Nikkhah 2001, Kordower et al. 2000, Maesawa et al. 2004, Piallat et al. 1996) o bien al transformar las neuronas GLUérgicas subtálamonigrales en GABAérgicas (Luo et al. 2002).

La acción excitotóxica glutamatérgica podría reforzarse con el GLU nigral liberado desde las aferencias provenientes de la corteza cerebral, el núcleo pedúnculo pontino o la amígdala (Rouillard y Freeman 1995), aferencias que también podrían estar hiperactivas en la EP (Breit et al. 2001, Nandi et al. 2002, Rodríguez et al. 1998). Tomados en su conjunto, todos estos estudios previos argumentan en favor del **GLU neuronal como agente de excitotoxicidad** en la EP, aunque existen distintos autores que cuestionan esta hipótesis con argumentos que también resultan de peso. Así pues, no todos los estudios experimentales han encontrado efectos tóxicos para el GLU o neuroprotectores para los inhibidores glutamatérgicos (Fornai et al. 2003,

Sonsalla et al. 1992, Obeso et al. 1989, Paul et al. 2004). Además, los estudios que comunican efectos tóxicos la muerte neuronal se induce con concentraciones de GLU generalmente mucho más elevadas (ej. 0.5 μ l de una solución 1.8 mM de GLU cada 12 horas durante 14 días para una lesión estriatal pericanular de 0.5 mm) (Mangano y Schwarcz 1983) que las que cabría esperar tras la liberación neuronal de GLU (Mangano and Schwarcz 1983, Obrenovitch et al. 2000, Chen et al. 1999, Toth and Lajtha 1989). La mayor parte de los estudios de excitotoxicidad han sido realizados “*in vitro*” (Hossmann 1994, Verity 1991) y por tanto, en condiciones no fisiológicas para el manejo del GLU extracelular (Obrenovitch y Urenjak 1997). El hecho de que la excitotoxicidad para una concentración dada de GLU “*in vivo*” sea mucho menor que “*in vitro*” (Obrenovitch y Urenjak 1997, Obrenovitch et al. 2000), la escasa influencia de la estimulación eléctrica de las neuronas GLUérgicas en los niveles extracelulares de GLU (Obrenovitch et al. 2000), y la mayor efectividad tóxica de los agonistas GLUérgicos en relación con el propio neurotransmisor cuando ambos son administrados “*in vivo*” (los agonistas son de 200 a 400 veces más tóxicos que el propio GLU) (Obrenovitch et al. 1994, Chen et al. 1999, Danbolt 2001, Davies y Roberts 1988, McDonald et al. 1998, Zaczek y Coyle 1982), sugieren que los transportadores gliales de GLU son tan eficientes que impiden que las concentraciones extracelulares de GLU alcancen niveles excitotóxicos (Obrenovitch y Urenjak 1997).

En muchos de los estudios comentados anteriormente no se toma en consideración que la glía también puede modificar la concentración extracelular de GLU por diversos mecanismos. El mecanismo más evidente de la **modulación glial del glutamato** extracelular es el asociado al ciclo neurona-glía-neurona para el GLU, un ciclo mediante el cual la glía secuestra GLU del espacio peri-sináptico metabolizándola a glutamina que es liberada al medio extracelular desde donde es recaptada por las terminales GLUérgicas para ser nuevamente metabolizada a GLU. El GLU neosintetizado puede ser almacenado en vesículas sinápticas para una nueva liberación o ser utilizado para generar energía (más del 50% de la energía neuronal proviene del glutamato). Lejos de los receptores GLUérgicos extracelulares, este GLU neuronal intracelular, no realiza acciones excitotóxicas. La reducción de la actividad de los transportadores gliales interrumpiría este ciclo (neurona-glía - neurona) dejando a los receptores neuronales expuestos a concentraciones crecientes de GLU. Se han descrito 5 transportadores de GLU (GLUt), tres en

neuronas (EAAT3; EAAT4 y EAAT5) y dos en células gliales (EAAT1 y EAAT2; conocidos también como GLAST y GLT-1). Los GLU_t gliales son más eficientes que los neuronales (Danbolt 2001), y al ser electrogénicos (conllevan la entrada en la célula de 3 Na⁺ y 1 H⁺, y la salida de 1 K⁺ por molécula de GLU) (Anderson y Swanson 2000, Levy et al. 1998) suponen un alto consumo energético (activación de ATPasas para recuperar el potencial de membrana) que es mejor tolerado por la glía que por las neuronas. La disposición perisináptica y la alta eficiencia de los GLU_t gliales (Danbolt 2001) probablemente mitigan la posible acción excitotóxica del GLU “*in vivo*”, una circunstancia que al no estar presente en las preparaciones “*in vitro*” podría explicar las diferencias en la toxicidad GLUérgica observadas cuando se comparan ambas condiciones. El procedimiento más expeditivo para bloquear el ciclo neurona-glía-neurona del GLU es la muerte de las células gliales, estado que acercaría la toxicidad “*in vivo*” del GLU a la observada “*in vitro*”. Junto a su acción excitotóxica sobre las neuronas, el GLU también genera acciones tóxicas sobre las células gliales. La toxicidad GLUérgica sobre la glía resulta particularmente eficaz en el caso de los oligodendrocitos, aunque también ha sido contrastada para astrocitos y microglía (Matute et al. 2006). La toxicidad del GLU en el caso de las células gliales también (al igual que en neuronas) podría estar mediada por su capacidad para inducir un incremento del Ca²⁺ intracelular mediado por la estimulación de receptores glutamatérgicos ionotrópicos o metabotrópicos, un fenómeno al que resultan más vulnerable los oligodendrocitos (Matute 2007) y menos vulnerable la microglía que sólo expresa receptores de GLU cuando está activada (Gottlieb and Matute 1997). A este mecanismo podrían añadirse otros como la activación de procesos inflamatorios (asociados a exposiciones de GLU breves pero intensas) y la producción de estrés oxidativo (asociadas a exposiciones más sostenidas) (Kordower et al. 2000).

Durante los últimos años se han descrito otros mecanismos gliales implicados en la modulación del GLU extracelular y que, a pesar de no haber sido estudiados en modelos de EP, podrían tener gran importancia para la acción excitotóxica del aminoácido. Uno de ellos es el intercambiador cistina-glutamato, transportador Na⁺-independiente que introduce cistina y saca GLU en las membranas celulares de neuronas y glía. La inhibición del intercambiador reduce hasta el 60% la concentración extrasináptica de GLU en el núcleo accumbens (Baker et al. 1999), lo que sugiere que este transportador aporta cantidades significativas de GLU a su reservorio

extrasináptico en condiciones basales. El GLU liberado por este antitransportador también podría modular la acción excitotóxica del GLU neuronal al actuar sobre los receptores metabotrópicos de GLU (Baker et al. 1999). Una acción presináptica similar ha sido descrita para la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Baker et al. 1999, Hu et al. 1999). Dado que el incremento extracelular de GLU puede bloquear la acción del antitransportador e impedir la entrada de cistina a la célula, un mecanismo de toxicidad adicional podría ser la reducción de la síntesis de glutatión (para lo cual la cistina es el factor limitante), facilitando así el estrés oxidativo celular. Además, el Ca^{2+} intracelular se acumula en la mitocondria produciendo su despolarización y facilitando la producción mitocondrial de radicales libres (Matute et al. 2006, Atlante et al. 2001, Luetjens et al. 2000), los cuales tras ser liberados al citosol y luego al medio extracelular, producen un bloqueo adicional del antitransportador cistina-glutamato limitando aún más la síntesis de glutatión (Kordower et al. 2000, Oka et al. 1993, Schubert and Piasecki 2001).

Otro mecanismo para la excitotoxicidad del GLU glial es la activación reversa de los transportadores de GLU gliales. Estos transportadores utilizan la energía potencial del gradiente transmembrana Na^+/K^+ para introducir GLU en las células y, por tanto, cualquier circunstancia que afecte a este gradiente (ej. déficit energético) puede hacer que los transportadores GLUérgicos funcionen de forma inversa, es decir, sacando GLU del citosol al medio extracelular (Lees 1991, Longuemare y Swanson 1995, Ouchi et al. 2005, Dronne et al. 2007). El GLU citosólico también puede ser liberado al medio extracelular por los hemicanales de los astrocitos, canales que pueden sufrir una apertura masiva (Hofer y Dermietzel 1998) en presencia de bajas concentración extracelulares de Ca^{2+} (Kamermans et al. 2001, Liu et al. 1995, Wilson et al. 2003) o por la acción del factor de necrosis tumoral (Takeuchi et al. 2006). Estos canales permiten el paso de sustancias de menos de 5000 daltons, por lo que productos de menor tamaño presentes en el citoplasma glial en altas concentraciones (como el GLU) pueden difundir masivamente hacia el espacio extracelular. El incremento de GLU extracelular puede estar también mediado por los canales aniónicos sensibles a volumen de las células gliales. Estos canales se abren en respuesta al aumento del volumen celular, haciéndose permeables a aniones orgánicos como el GLU (Turner-Stokes y Jackson 2002, Strange et al. 1996). Se ha sugerido que el bloqueo de estos canales (ej. con tamoxifeno) podría reducir la excitotoxicidad inducida por la

liberación de GLU durante la depresión propagada (“spreading depression”) neuro-glial (Basarsky et al. 1999, Gorji 2001). Recientemente se ha publicado la existencia de vesículas glutamatérgicas en células gliales (con VGLUT3 como transportador) (Montana et al. 2004, Zhang y Sulzer 2004) con capacidad para liberar GLU de forma Ca^{2+} -dependiente (Parpura et al. 1994) similar a la liberación neuronal (Bezzi et al. 2004, Montana et al. 2006). Los factores que inducen *ondas intracitosólicas de Ca^{2+}* podrían activar la exocitosis masiva y simultánea de grandes cantidades de GLU glial al medio extracelular ,ya que el calcio citosólico se propaga a gran velocidad por las uniones huecas de unas células gliales a otras (Hazell 2007). Finalmente, el ATP o la adenosina glial también podrían estar implicados en la acción excitotóxica del GLU. Se ha evidenciado una acción excitatoria bidireccional entre el GLU y el ATP (Jeremic et al. 2001, Mongin y Kimelberg 2005). Son de gran interés los estudios que muestran como el ATP extracelular puede activar la liberación de GLU (Duan et al. 2003, Rodrigues et al. 2005, Fellin et al. 2006, Franke et al. 2006), mediando posiblemente en la excitotoxicidad potencial del reservorio glial de GLU. La concentración intracitosólica glial de ATP se encuentra en el rango mM, por lo que dado su bajo peso molecular podría ser liberado junto con el GLU por algunos de los canales antes mencionados (hemicanales, canales aniónicos sensibles a volumen...). Esta liberación de ATP amplificaría en segunda instancia la liberación de GLU a través de los receptores P2 de ATP, los cuales pueden formar canales de membrana permeables a moléculas de hasta 900 daltons por donde el GLU atravesaría la membrana celular por simple difusión (Basarsky et al. 1999).

Por lo tanto, la glía al disponer de grandes cantidades de GLU en su citosol (concentraciones de 1 a 3 mM) que pueden ser liberadas por cualquiera de los mecanismos comentados (inhibición o activación reversa de los transportadores de GLU, bloqueo del antitransportador cistina-glutamato, apertura de hemicanales o de canales aniónicos sensibles a volumen y/o liberación del GLU vesicular) podrían desencadenar efectos excitotóxicos mucho más marcados que los del GLU neuronal que dispone de menores cantidades de GLU y que está sometido a la acción protectora de la glía. La liberación del GLU glial resultaría tóxico no sólo para la propia glía que lo libera (ya que ahora podría actuar sobre sus receptores GLU de membrana), sino también para las neuronas del entorno. En ambos casos las neuronas serían las finalmente perjudicadas ya que, por cualquiera de estos mecanismos, se produciría una merma en la capacidad glial para atenuar los

excesos extracelulares de GLU, facilitando así la acción excitotóxica del GLU en las neuronas. Además, con la pérdida de astrocitos se reduciría la capacidad de estas células como agentes de soporte neural, y disminuiría su aporte de factores neurotróficos y neuroprotectores. La acción de algunas sustancias neuroprotectoras de bajo peso molecular como el GABA o la taurina son especialmente interesantes, ya que también podrían ser liberados por las células gliales a través de los mecanismos para la liberación de glutamato arriba comentados. En esta Memoria estudiaremos los mecanismos gliales asociados a la liberación de GLU como agente neurotóxico y de otras sustancias que como la taurina y el ATP, podrían resultar neuroprotectores.

Las **células microgliales** han sido otras de las células de la glía implicadas en la génesis de la enfermedad de Parkinson. La participación de la reacción inflamatoria en la degeneración de las células DA del cerebro medio se sugirió por primera vez al observarse un aumento de *microglía activada* (inmunorreactivas para la compleja mayor de histocompatibilidad II; MHC) en la SN de pacientes con EP (McGeer et al., 1988). La presencia de la microglía activada (Beal 1998, Hartmann, Hunot and Hirsch 2003, Pothos et al. 1998, Mount et al. 2007, Nagatsu et al. 2000a, Nagatsu et al. 2000b, Raivich et al. 1999) fue luego confirmada con otros marcadores de activación de la microglía (Mogi et al. 1994). La expresión de *receptores de algunas citoquinas* en las neuronas DAérgicas de la SN de pacientes parkinsonianos, como el factor α de necrosis tumoral (TNF), interleucina (IL)- 1β y el interferón γ (Boka et al. 1994), así como la *inducción por citoquinas* en la SN compacta de las enzimas óxido nítrico sintetasa, ciclooxigenasa-2, y NADPH oxidasa, productoras de especies reactivas tóxicas (Hunot et al. 1996), indican la sensibilidad de estas neuronas a los efectos de las citoquinas. Así pues, aunque una parte muy relevante de la acción tóxica del estrés oxidativo sobre las neuronas dopaminérgicas es probablemente de naturaleza endógena, esta acción tóxica también puede tener origen exógeno. La activación de la microglía en animales induce muerte neuronal por diversos mecanismos (Priller et al. 2001, Streit et al. 1999, Barcia et al. 2004, McGeer et al. 1988, Ouchi et al. 2005, Teismann y Schulz 2004, Langston et al. 1999, Hartmann et al. 2003, Mount et al. 2007) entre los que se incluye la producción y liberación de *agentes oxidantes* (Calingasan et al. 1999, Calingasan et al. 1998, Liberatore et al. 1999, Gao et al. 2003, Qin et al. 2002, Wu et al. 2003, Zhang y Sulzer 2004). En los estudios practicados en esta memoria también se ha incluido la respuesta de la microglía a la acción del GLU.

OBJETIVOS EXPERIMENTALES GENERALES DE LA PRESENTE MEMORIA

A partir de los datos comentados en la Introducción se establecieron los objetivos iniciales del trabajo experimental de la Memoria, objetivos que luego sufrieron algunas adaptaciones a partir de los datos que se iban obteniendo. El objetivo central era la evaluación del reservorio glial de glutamato como fuente de excitotoxicidad para las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Para afrontar los estudios encaminados hacia este objetivo central se establecieron un conjunto de objetivos parciales entre los que inicialmente se encontraba el estudio de los posibles mecanismos de liberación del glutamato en la sustancia negra y en el estriado. El inicio de los trabajos y la obtención progresiva de datos permitieron reorientar y acotar los objetivos en aspectos más parciales que fueron abordados de forma más pormenorizada. Para ello se practicaron dos tipos de estudios:

1. Evaluación de la **influencia de la transmisión DAérgica sobre el comportamiento del GLU glial,**
2. Evaluación de la **influencia del GLU glial sobre los cambios funcionales y la pervivencia de las neuronas DAérgicas y GLUérgicas, así como de células gliales:**
 - **Acción neurotóxica del GLU glial** sobre las terminales, el axón y el soma de las neuronas DAérgicas;
 - **Acción neurotóxica del GLU glial** sobre los astrocitos (liberadores de agentes neuroprotectores y aceptores para excesos de GLU) y la microglía (implicada en la respuesta inflamatoria de la EP);
 - **Acción neurotóxica del GLU glial** sobre poblaciones celulares no dopaminérgicas que inervan el soma o los terminales de las neuronas DAérgicas (neuronas tálamo-estriatales). Probablemente implicadas en el desarrollo de los trastornos motores complejos (marcha...) y de los trastornos no motores (atención...) habituales en los estadios avanzados de la enfermedad.

Por tanto, en esta memoria se estudió la interacción de tres factores considerados hoy esenciales para la progresión de la EP: la modificación de la transmisión DAérgica, la excitotoxicidad glutamatérgica y la alteración de la actividad glial.

MATERIAL Y MÉTODOS: ASPECTOS GENERALES

En esta sección se describirán las técnicas y los materiales utilizados para la determinación de las distintas sustancias estudiadas en este trabajo. Los protocolos seguidos en cada uno de los experimentos serán comentados con posterioridad en un apartado en el apartado de Experimentos, donde se agrupa el diseño de cada estudio con los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

Este bloque inicial se encuentra dividido en seis subapartados: Animales de experimentación, Anestesia y cirugía estereotáxica, Microdiálisis, Cromatografía líquida de alta resolución, Estudio morfológico y Análisis estadístico.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Los estudios se llevaron a cabo en ratas Sprague-Dawley macho con pesos comprendido entre 300 y 350 g. Los animales, suministrados por el Animalario Central de la Universidad de La Laguna, fueron mantenidos en grupos de dos por jaula y con libre acceso a comida y bebida. Las ratas para experimentación permanecieron en un ciclo estándar de luz-oscuridad (12-12 horas; luz encendida entre las 8:00 y las 20:00) durante las dos semanas previas a su utilización y con temperatura ambiental regulada (20-22° C).

Todos los protocolos experimentales utilizados cumplen la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea, de 24 de Noviembre de 1986 (86/609/CEE), sobre cuidado y uso de animales para procedimientos experimentales, así como las medidas adecuadas para minimizar el dolor y las molestias en los animales durante el periodo de cuarentena y durante su utilización experimental.

ANESTESIA Y CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.

A pesar de los posibles efectos inespecíficos de la anestesia, (de Lange et al. 1997, Dildy-Mayfield et al. 1996, Martin et al. 1995, Miyazaki et al. 1997, Mantz et al. 1995, Mason et al. 1996), todos los estudios fueron realizados en animales anestesiados. Con esto se consiguió evitar acciones colaterales que resultarían en artefactos poco controlables. Los trabajos realizados se orientaron hacia el estudio de los mecanismos locales y no al

estudio de las funciones fisiológicas sistémicas (ej.: la conducta). Se precisaba que los animales se encontraran en condiciones estables, evitando que variables globales asociadas a aspectos tan generales como el dolor o el estrés inducido por la administración del producto, pudieran generar cambios en los mecanismos a estudiar. La sustancia negra y el estriado reciben y modulan la información proveniente de todas las regiones de la corteza cerebral, participando de forma activa en la elaboración y ejecución de los planes motores. Por su función y por diversas características de las poblaciones neuronales que lo integran, ambos centros resultan particularmente sensibles a las acciones ambientales (estímulos visuales, auditivos, táctiles...) a las expectativas (premio-castigo, atención...). Por todo ello, se consideró conveniente realizar todos los estudios con el animal anestesiado.

Anestesia.

En función de los metabolitos a estudiar la sustancia anestésica usada fue distinta. Así tenemos que para los experimentos en los que se cuantificó extracelularmente catecolaminas y sus metabolitos derivados, las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (Acofarma, Barcelona) al 8% en salino (350 µl de hidrato de cloral / 100 gramos de rata), mientras que en los estudios en los que se evaluaron los niveles extracelulares de aminoácidos se utilizó equitensín (Rozza et al., 2000), un anestésico generado por la mezcla de agentes depresores (pentobarbital asociado a hidrato de cloral y a etanol) que no modifica los niveles basales de estas moléculas y que permite una anestesia prolongada y estable (Rodríguez et al. 1998). El equitensín se elaboró siguiendo el protocolo propuesto por Rozza y colaboradores (Rozza et al. 2000), de forma que para la preparación de 500 ml de equitensín se precisó de:

- 21,25 g de hidrato de cloral disueltos en 49,4 ml de etanol absoluto,
- 4,86 g de pentobarbital sódico diluidos en 21 ml de agua bidestilada (Milli Q Gradiente A10, Millipore),
- mezclar ambas soluciones y agregar 198 ml de 1,2-propilenglicol,
- 10,63 g de sulfato magnésico disueltos en 50 ml de agua bidestilada (Milli Q Gradiente A10, Millipore),
- añadir agua bidestilada (Milli Q Gradiente A10, Millipore) a la solución hasta completar los 500 ml.

Componentes	Código	Casa comercial
Hidrato de cloral	3227	Acofarma, Barcelona
Etanol absoluto	41086	Panreac química SLU, Barcelona
Pentobarbital sódico	Doletal	Vetoquinol, Madrid
1,2-Propilenglicol	P4347	Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
Sulfato magnésico	141404	Panreac química SLU, Barcelona

Tabla 1. Componentes del equitensín

El equitensín se administró por vía intraperitoneal con una dosis inicial de 5 ml/kg (1,5 ml para una rata de 300 g) que induce tras 5-10 minutos una sedación progresiva y una anestesia profunda.

El equitensín/hidrato de cloral se empleó, al transcurrir 60 minutos de la administración de la primera dosis de anestésico, de forma continuada y a una velocidad de 0,5 ml/hora mediante perfusión peritoneal (Perfusor Modelo “11” Syringe Pump Series, Panlab; Harvard Apparatus, MA, EE.UU.) consiguiendo mantener al animal anestesiado de manera estable durante tiempo prolongado.

Para la realización de la lesión de las células dopaminérgicas con 6-OHDA (6-hidroxidopamina clorhidrato, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) inyectada en el tercer ventrículo (Rodríguez Diaz et al. 2001, Rodríguez, et al. 2001), las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con ketamina (25-40 mg/kg; Rhone Merieux; Lyon, Francia) y xilacina (3-6 mg/kg, Bayer, Leverkusen, Alemania). La mezcla de estos productos anestésicos presenta dos propiedades, por un lado consigue una sedación rápida y profunda en los animales y por otro, sus efectos desaparecen en cuestión de minutos, lo cual les hace aconsejables para intervenciones cortas y recuperaciones rápidas, evitando problemas posteriores causados por sedaciones prolongadas.

Cirugía.

El animal anestesiado fue colocado en el aparato estereotáxico (modelo SR-6, Narishige, Japón), donde se fijó por el maxilar superior (4 mm por

debajo de la línea interaural) y por los conductos auditivos internos. Una vez en el estereotáxico, al animal se le introdujo una sonda rectal para el control de la temperatura y se le cubrió con una manta térmica (termorregulador RTC-1, Cibertec, Madrid) con el fin de mantener su temperatura estable a $36,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$ durante todo el experimento (Rodríguez y González-Hernández 1999). Se practicó una incisión longitudinal en la piel de la cabeza dejando al descubierto la calota. Tras la separación de la piel y el control del sangrado, se localizó el bregma (referencia para el cálculo de las coordenadas estereotáxicas del estriado y del tercer ventrículo) y el lambda teórico (referencia para el cálculo de las coordenadas de la SN) para posteriormente practicar la trepanación del cráneo (con un trocar que gira a baja velocidad) en la zona correcta de estudio. Se seccionó y retiró la duramadre, y se insertó en función del experimento realizado, bien una cánula de microdiálisis o bien una jeringa Hamilton (Hamilton 701RN, Supelco, PA, EE.UU.) en la zona correspondiente.

Zonas de actuación	Anteroposterior (AP)	Lateral (línea media)	Profundidad *
Sustancia negra	3,0 mm al lambda teórico	2,0 m	8,0 mm
Estriado	1,0 mm al bregma	2,5 m	7,5 mm
3^{er} ventrículo	-2,0 mm al bregma	0,0 m	8,0 mm

SN: Sustancia negra. * Bajo la dura.

Tabla 2. Coordenadas estereotáxicas de las zonas donde se realizaron los trabajos experimentales (Paxinos y Watson, 1986)

Al final de cada experimento las ratas recibieron una sobredosis de hidrato de cloral y fueron perfundidas transcárdialmente con 200 ml de solución salina 0,9% (B. Braun Medical S.A., Barcelona) y 400 ml de paraformaldehído (PFA) (Panreac, Barcelona) al 4% (Fox et al.1987) en tampón fosfato salino o PBS 0,1M (PH = 7,4). Se extrajeron los cerebros y se almacenaron en la misma solución de fijación durante 12 horas a 4°C, siendo luego incluidos en una solución crioprotectora de sacarosa (Panreac, Barcelona) al 30% (p/v) en tampón fosfato hasta su completa inmersión (48h). Los cerebros se cortaron en secciones de 30 μm de grosor siguiendo el plano transversal en un microtomo de congelación (Microm HM 450, Thermo Scientific, MA., EE.UU.). Estas secciones fueron recogidas en 7 series paralelas. Algunos de los cortes se les aplicó el procedimiento de la tinción de Nissl (violeta de cresilo, Sigma, EE.UU.) para confirmar la correcta

colocación de la cánula de microdiálisis y el resto fueron guardados en el congelador de -80° C hasta su posterior procesamiento morfológico.

Lesión de las neuronas dopaminérgicas.

A algunos animales (9 ratas) se les practicó una leve degeneración del sistema dopaminérgico nigro-estriatal según protocolo publicado con anterioridad por el laboratorio (Rodríguez Díaz, et al. 2001, Rodríguez et al. 2001) y que induce una degeneración moderada y simétrica de las neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales similar a la observada en las primeras etapas la enfermedad de Parkinson.

La lesión se realizó inyectando (Hamilton 701RN, Supelco, PA, EE.UU.) en el tercer ventrículo 250 µg de 6-OHDA (6-hidroxidopamina clorhidrato, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) en una dosis única preparada en una solución salina estéril (0,9%; Fisiológico Braun NaCL-0.9, B. Braun Medical S.A., Barcelona) con un 2% de ácido ascórbico (Merck, Whitehouse station, NJ, EE.UU). La solución de 6-OHDA fue administrada a una velocidad de 2 µl/min (volumen total 12 µl). De veinte a treinta minutos antes de realizar la inyección con 6-OHDA, las ratas fueron tratadas con nortriptilina intraperitoneal (nortriptilina clorhidrato, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) a razón de 30 mg/kg en salino (Fisiológico Braun NaCL-0.9, B. Braun Medical S.A., Barcelona) para proteger a las células noradrenérgicas de la degeneración. Esta operación se realizó con ratas anestesiadas con ketamina-xilacina según las dosis descritas en el subapartado de Anestesia .

MICRODIÁLISIS

La microdiálisis o perfusión intracerebral in vivo es una técnica que permite monitorizar las concentraciones extracelulares de los distintos componentes neuroquímicos (sustancias y metabolitos) de los tejidos específicos donde se implanta. Este sistema permite el paso continuo de líquido de perfusión a través de la membrana de diálisis de la cánula ubicada en el área del cerebro a estudiar. La cánula recoge las sustancias químicas presentes en el líquido intersticial circundante que, siguiendo las leyes generales de la difusión de solutos, son capaces de atravesar la membrana

semipermeable. El fluido recogido por la cánula de diálisis, o dializado, es indicativo de la concentración de las sustancias en el líquido extracelular. La relación entre la concentración de una sustancia en el dializado y en el líquido extracelular del tejido donde se encuentra la cánula, dependerá de los procesos que acontecen y controlan la concentración de las sustancias alrededor de la cánula (el intercambio extracelular, el intercambio microvascular, el metabolismo y la difusión de la sustancia).

Durante los estudios de microdiálisis de la presente Memoria se tuvieron en cuenta las siguientes circunstancias (de Lange et al. 1997, Benveniste y Huttemeier 1990, Westerink et al. 1987):

- Se produce un efecto de dilución del analito que conlleva el uso posterior de métodos analíticos lo suficientemente sensibles como para detectar pequeñas concentraciones en muestras de escaso volumen (1-10 μ l).
- La determinación “in vitro” de la recuperación de cada cánula es imprescindible para el cálculo de los niveles absolutos de los analitos en el líquido extracelular.
- La naturaleza invasiva del implante de la cánula de microdiálisis produce leves modificaciones en el tejido circundante.
- Permite realizar estudios cinéticos de pequeñas fracciones de muestra con una alta frecuencia (minutos), durante horas y con escasa modificación de la concentración de los analitos estudiados.
- Posibilita el muestreo en pequeñas regiones tisulares proporcionando información específica sobre los acontecimientos bioquímicos que se producen en un radio de acción corto (< 1 mm)
- Permite la determinación simultánea de distintos analitos en distintas regiones.
- Puede utilizarse para determinaciones bioquímicas “en línea”.
- Proporciona muestras libres de proteínas.
- Permite evaluar las sustancias disueltas en el medio extracelular de forma selectiva, evitando la contaminación de las sustancias del medio intracelular.
- Posibilita la administración local de sustancias (diálisis reversa).

Tipo de cánula

La forma de la cánula y el material de la membrana influyen en los datos obtenidos por microdiálisis. El material de la membrana determina la permeabilidad al analito en función del peso molecular (el punto de corte en nuestra cánula fue de 5 kDa). La forma de la cánula se eligió en base a la accesibilidad quirúrgica y a la naturaleza del tejido. Las cánulas de microdiálisis empleadas en los experimentos fueron cánulas concéntricas de 220 μm de diámetro y con 1 a 6 mm de longitud, diseñadas y construidas íntegramente en nuestro laboratorio. (Rodríguez et al. 1998, Garcia Dopico et al. 2004, Rodriguez Diaz, et al., 2005). En la figura0, se presenta un esquema de la cánula y en la tabla 3 las medidas y materiales utilizados en su construcción.

Los pasos seguidos para la construcción de las cánulas son los siguientes:

- Primero, se introduce un capilar de sílice gruesa (figura0, a) dentro de un capilar de vidrio transparente (figura0, b) sellando por ambos extremos el capilar de vidrio transparente con pegamento de contacto (Superglue-3®, Loctite) para impermeabilizarlo.
- Segundo, al complejo creado se le inserta un tubo de polietileno (figura0, c) y se sella dejando el extremo proximal libre para ensamblar el resto de la estructura.
- Tercero, se coloca la membrana de microdiálisis (figura0, d) en el interior del extremo distal del capilar de sílica gruesa (figura0, a) y se sellan los bordes de contacto entre ambas.
- Cuarto, el capilar de sílica fina (figura0, e) de recogida del dializado se introduce por su extremo proximal en el interior del complejo hasta llegar a la membrana, donde se introduce dejando 0,5 mm libres. La superficie de intercambio final será aproximadamente de 2 mm para la SN y de 4 para el estriado.
- Quinto, se introduce en el extremo proximal de la estructura uno de los capilares de polietileno (figura 0, f), que limitan al capilar de sílica fina de perfusión (figura 0, g) y se sella.
- Y en último lugar, la parte distal de la membrana de diálisis es sellada con pegamento, dejada secar y cortada en bisel. La punta de la cánula ($\approx 1\text{mm}$) se hace impermeable y adquiere algo de consistencia para penetrar con mayor facilidad en el tejido.

Componente	Longitud (mm)	ϕ interno (μm)	ϕ externo (μm)
a. Capilar de sílica gruesa *	15-20	250	350
b. Capilar de vidrio transparente *	5	450	600
c. Tubo de polietileno *	5-10	600	1000
d. Membrana de microdiálisis **	8-10	200	200
e. Capilar de sílica fina de recogida *	70-80	74	145
f. Capilar de polietileno***	5	250	350
g. Capilar de sílica fina de perfusión *	35-40	74	145

* Composite Metal Services LTD, RU **Gambro dialysatoren GmbH & Co. KG, Alemania
 ***CMA Microdialysis AB, Suecia.

Tabla 2. Cánula de microdiálisis: materiales y medidas

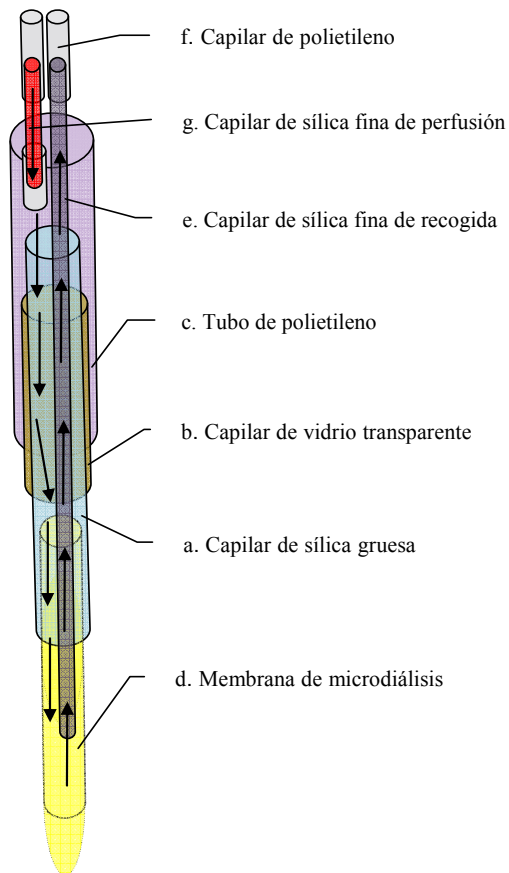


Figura 0. Esquema de la cánula de microdiálisis

Una vez confeccionada la cánula, se conecta por el capilar de sílica fina de perfusión (figura0, g) al tubo de polietileno de 20 y 26 gauges procedente de la jeringa (vidrio 2.5 ml, CMA, Suecia) que contiene la solución a perfundir, mientras que el extremo del capilar de sílica fina de recogida (figura0, e) se deposita en el vial de recogida del recolector automático de muestras (colector de dializado 142, CMA, Suecia).

Las membranas utilizadas en la construcción de estas cánulas de microdiálisis son las empleadas en la hemodiálisis de riñón. El material de estas membranas es el cuprofano o celulosa regenerada (Gambro dialysatoren GMBH & Co. KG, Hechingen, Alemania) que permite el intercambio de moléculas con un peso molecular inferior a los 5 kDa (kilodaltons), esta característica fue utilizada tanto para la administración local de sustancias como para la obtención de solutos desde el medio extracelular de la zona a estudio. La longitud útil de intercambio de la membrana de diálisis para estudiar la SN fue de 2 mm y para el estriado de 4 mm (Kónig y Klippel, 1967).

Intervalo de adaptación de la cánula.

El implante de la cánula de microdiálisis produce algunas reacciones inespecíficas en los tejidos implantados (Benveniste y Diemer 1987, Benveniste et al. 1987, Shuaib et al. 1990), pudiendo provocar inflamación y, en consecuencia, interferir en los resultados de los experimentos. Para minimizar las interferencias, se debe establecer un intervalo de tiempo de espera o de adaptación tisular desde el implante de la cánula hasta el comienzo del estudio que permita la estabilización de las concentraciones de las sustancias presentes en el espacio extracelular. El tiempo de espera se redujo, respecto al observado en cánulas comerciales, al modificar la punta de la cánula (Tesis doctoral de J.A. García Dopico) haciéndola menos traumática. La punta fue dotada de un bisel en forma de lanceta e introducida lentamente (1 mm/min) permitiendo la adaptación progresiva del tejido. A pesar de que se alcanzó niveles de estabilidad a los 30 min de implantar la cánula, los estudios se realizaron tras un tiempo de adaptación comprendido entre 120 y 150 minutos. Transcurrido el cual, se recogieron muestras cada 10 o 20 minutos (según se especificará posteriormente en cada estudio) durante el curso de cada experimento. Los dializados obtenidos son procesados “on

line” para el estudio de catecolaminas o bien almacenados a -80 °C hasta el momento de su procesamiento y análisis en el estudio de aminoácidos.

El medio de perfusión.

El flujo del medio de perfusión afecta a la recuperación y a la resolución temporal de las medidas de las muestras. Diversos ensayos han determinado cómo se ve afectada la recuperación en función de distintos parámetros (Johnson y Justice 1983, Levine y Powell 1989, Lindfors et al. 1989, Tossman y Ungerstedt, 1986). Estos estudios han revelando que la recuperación se incrementa linealmente con el aumento de la concentración del soluto en el medio extracelular y con el incremento de la superficie de intercambio de la membrana de microdiálisis. Igualmente, se ha demostrado que la recuperación disminuye al aumentar el flujo debido a que se incrementa la presión intra cánula y que, tras superar la del líquido cefalorraquídeo (LCR) circundante, origina un transporte neto de fluido a través de la membrana que reduce la difusión de las moléculas hacia el interior de la cánula. Para evitar esta disminución se aplicaron flujos de perfusión de 2 µl/min mediante la utilización de bombas de microperfusión para microdiálisis (Microdialysis Pump 102, CMA, Suecia).

En los experimentos se ha empleado como medio de perfusión el líquido cefalorraquídeo artificial (LCR artificial) de composición salina similar al fluido intersticial del cerebro descrita por Herrera-Marschitz y colaboradores (Herrera-Marschitz et al. 1996) y cuyos componentes se detallan en la tabla 4. Una vez preparado y antes de ser utilizado se le ajusta el pH a 7,2 y se pasa a través de filtros de 0,2 µm de diámetro de poro (Pall Corporation, Port Washington, NY, EE.UU) en el laboratorio.

Producto	PM	[] (g/l)	[]final(mM)	Código
NaCl*	58,44	8,649	148	1.06404.1000
KCl*	74,55	0,201	2,70	1.04936.0500
CaCl₂ · 2 H₂O**	147,02	0,176	1,20	23821.0550
MgCl₂ · 6 H₂O*	203,30	0,172	0,85	5833.0250

* Merck, Whitehouse station, NJ, EE.UU **Panreac, Barcelona, España

Tabla 3. Composición de la solución de perfusión: LCR o Ringer

Se utilizaron variaciones controladas del LCR artificial para investigar propiedades del sistema en estudio. Los componentes añadidos eran lo suficientemente pequeños para atravesar la membrana semipermeable de la cánula e influir en el tejido (tabla 6). En otros experimentos se modificó la concentración del cloruro sódico originando cambios en la osmolaridad del líquido cefalorraquídeo artificial (Herrera-Marschitz et al. 1996). La osmolaridad fue medida en todos los casos con un auto-osmómetro (Osmostat OM-6020; CagaK Co. Ltd., de Kyoto, Japón), siendo la osmolaridad normal del LCR artificial de 285 mOsm.

Nombre del producto		Código producto / Casa comercial
Adenosina	-----	A-9251/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico	A-1455/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
Ácido ascórbico	Vitamina C	100127/ Merck, Whitehouse station, NJ, EE.UU
ATP	Adenosina 5'-trifosfato	A1852/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxalina-2,3-dione	C-169/ RBI, Natick, MA, EE.UU.
DA	3-Hidroxi-tiramina, Dopamina	H-8502/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
L-GLU	L-Glutamato	G-2128/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
Haloperidol	-----	H-1512/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
KA	Ácido kainico	G-020/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
2Me-SATP	Sal 2-Metiloadenosina trifosfato tetrasódica	1062/ Tocris, Bristol, RU.
NMDA	N-metil-D-aspartato	M-3262/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
PDC	L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxilato	0298/ Tocris, Bristol, RU.
MSO	Metionina sulfoximina,	M-5379/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
PPADS	Ácido piridoxalfosfato 6-azofenil-2',4'disulfónico	0625/ Tocris, Bristol, RU.
CL- Colina	Cloruro de colina	C-1879/ Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.

Tabla 4. Reactivos perfundidos por la cánula de microdiálisis en los distintos experimentos.

Recuperación por la cánula.

La capacidad de recuperación de las cánulas es otro factor a tener en cuenta en los experimentos. La recuperación de una sustancia se define como la relación entre la concentración de una sustancia en el dializado y su concentración uniforme fuera de la cánula.

La mayoría de los autores realiza una medida sencilla de la recuperación [o eficiencia de extracción (EE) de la cánula] (Ao et al. 2004, Wang et al. 2007) introduciendo la cánula en una solución externa con idéntica composición que la del líquido de perfusión y con una concentración conocida del analito a estudiar. Tras determinar la concentración del analito en el dializado, se podrá por extrapolación, realizar la estimación las concentraciones de soluto fuera de la cánula en función de las cuantificadas en el dializado y determinar la variación relativa del analito a lo largo del experimento.

$$EE = \frac{C_d - C_i}{C_e - C_i}$$

C_d : concentración de la sustancia de interés en el dializado

C_i : concentración de la sustancia de interés en el líquido de perfusión

C_e : concentración de la sustancia de interés en el medio externo

Tras la estabilización del sistema de perfusión, la cánula de microdialísis es introducida en un vial con una mezcla de concentración conocida de aminoácidos. Tras el intercambio intra-extra cánula, se recoge el dializado durante 30 min y se analiza la concentración de aminoácidos tanto en la muestra del vial como en el dializado. A partir de la concentración de aminoácidos presentes en ambas muestras se calcula la recuperación relativa (RR) de la cánula (Ao et al. 2004, Wang et al. 2007). Las cánulas usadas fueron aquellas que poseían una tasa de recuperación de entre un 15% y un 35%, el resto fueron desechadas.

$$RR (\%) = \frac{C_d}{C_e} \cdot 100$$

$$RR = EE \cdot 100$$

C_i : en el caso de los test "in vitro" la concentración de la sustancia de interés en el líquido de perfusión es cero.

Utilizando este procedimiento se obtuvo el perfil de recuperación para los aminoácidos que se muestra en la figura 2. Como se observa, la recuperación no fue igual para todos los aminoácidos, siendo mayor para la serina (Ser) y la tirosina (Tyr) y menor para la glutamina (Gln) y la treonina (Thr).

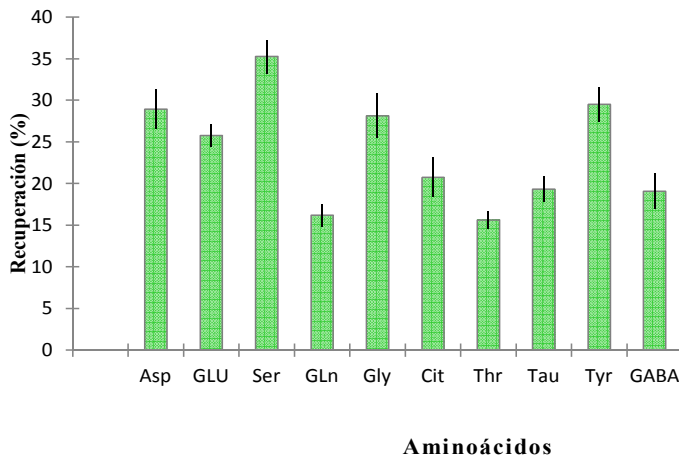


Figura 1. Porcentaje de recuperación de la cánula "in vitro" para aminoácidos

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

El análisis de las sustancias objetivo de las muestras obtenidas se realiza mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de fase reversa (empaquetamiento hidrofóbico de la columna) acoplado a un detector. Basada en los distintos coeficientes de reparto (distribución) de las diferentes sustancias entre las dos fases líquidas e inmiscibles, la fase móvil y la fase estacionaria, y donde ésta última es más apolar que la primera.

Esta técnica es altamente eficiente en la separación de los analitos debido al empleo en la fase estacionaria de columnas empaquetadas con componentes de tamaño de partícula pequeño y con una capacidad de interacción muy superior a la de la cromatografía convencional. El material más usado en la fase estacionaria es la "sílica" (sílice modificada) que permite formar una matriz tridimensional de partículas de gran rigidez mecánica. El menor tamaño de las partículas de la fase estacionaria confiere una elevada

resolución cromatográfica, originando picos de elución muy estrechos en el cromatograma (figuras 3 y 4). El cromatograma es la presentación gráfica de la respuesta del detector (valores digitales), bien de la concentración o bien de otra magnitud de medida de la concentración de un analito en la fase móvil que abandona la columna frente al volumen del eluyente o frente al tiempo (García Dopico et al. 2004, Rodríguez Díaz et al. 2005).

Estas columnas ofrecen gran resistencia al flujo de líquidos, por lo que se requieren altas presiones de hasta 400 atm (6.000 psi sistema anglosajón), para hacer pasar la fase móvil de un extremo a otro.

Para obtener el máximo rendimiento en la separación, identificación y cuantificación de sustancias en una mezcla compleja con columnas de HPLC se utilizan sistemas o equipos integrados donde todos sus componentes (el inyector o dispositivo para la aplicación de la muestra, el sistema de bombeo, la columna, las conducciones y el detector en flujo continuo) estén específicamente acoplados y diseñados.

La fase móvil puede ser considerada como una solución acuosa de un disolvente orgánico que aumenta el carácter hidrofóbico del eluyente. El tipo y la concentración del solvente determinarán el poder extractor. Los eluyentes más utilizados son líquidos orgánicos: metanol, acetonitrilo, propanol, tetrahidrofurano... con un alto grado de pureza (especiales para HPLC) ya que, la sensibilidad de los detectores es tan elevada que las impurezas de los solventes interfieren en la detección de los analitos. Antes de ser usada y para mantener flujos estables y disminuir las fluctuaciones en la línea basal del cromatograma, la fase móvil es filtrada por membranas de 0,2 μm de tamaño de poro, eliminando cualquier residuo sólido, y desgasificada por sonicación mediante ultrasonidos durante 15 minutos (Ultrasonic Cleaner JkM. CE), haciendo desaparecer la mayor parte de las burbujas de aire existentes. Posteriormente los eluyentes atraviesan un desgasificador (Waters inline Degasser AF) que permite eliminar en su totalidad los gases del eluyente antes de que sea comprimido por las bombas de alta presión.

Las bombas del sistema de HPLC deben ser capaces de proporcionar flujos estables y precisos, en el intervalo de 0,1-10 ml/min. Para los experimentos se han empleado 2 tipos de bombas Waters 1525 Binary para estudios de aminoácidos, y la bomba Waters 515 HPLC Pump para catecolaminas, todas de comportamiento estable y resistentes al uso intensivo.

El análisis de los datos pasa por la identificación e integración de los picos de elución presentes en el cromatograma para unas condiciones de elución dadas y para una misma columna. El programa informático Empower (Empower Software, Waters, MA, EE.UU) analiza el perfil comparando cada valor digital recibido con el previo y el posterior, detectando cuando se produce un pico y asignándole un valor de tiempo de retención. La correcta integración de los picos cromatográficos considera además de la suma de los valores de la señal digitalizada (desde el comienzo hasta el final del pico), las derivas experimentadas por la línea basal del cromatograma. Este tipo de correcciones permite cuantificar analitos con un error inferior al 5%.

Análisis de aminoácidos por HPLC

El equipo en el que se realizaron las medidas de los aminoácidos de las muestras experimentales está compuesto por los siguientes elementos:

Componentes *	Nombre comercial
Muestreador automático	717 Autosampler
Horno – Control de Temperatura	TCM, Horno Waters
Desgasificador	Inline Degasser AF
Bombas	1525 Binary HPLC Pump
Columna	Novapack C18, 3.9 x 150 mm
Detector Fluorescencia	474 Scanning Fluorescence
Programa informático	Empower Software

* Water Chromatography Division, Milipore Corporation, Milford, MA, EE.UU.

Tabla 5. Componentes del equipo de HPLC

Los aminoácidos no presentan buenas propiedades físico-químicas que les permitan ser cuantificadas con suficiente sensibilidad por ello se realiza una derivatización precolumna. La derivatización consiste en la modificación de los aminoácidos de la muestra a analizar haciéndolos reaccionar químicamente con el orto-ftaldehído (OPA, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU) en condiciones alcalinas (pH 9-11), dando un compuesto fluorescente (Rizzo et al., 1996) que permite ser registrado. Para ello, la muestra (10 µl) se introduce en un vial en el carrusel del inyector automático (Waters 717 Autosampler).

El muestreador automático se programa para efectuar la reacción de derivatización precolumna, primero mezcla 10 µl de OPA con 10 µl de muestra y tras 2 minutos en los que transcurre la reacción, añade 5 µl de ácido acético al 5 % (v/v) deteniendo la reacción por acidificación del medio. A continuación la muestra derivatizada es introducida en la columna por el inyector automático poniéndose en marcha las bombas (Waters1525 Binary HPLC Pump) e iniciando la separación de los aminoácidos.

Para mejorar la separación y el análisis de los aminoácidos se empleó la elución en gradiente, mezclando en distinta proporción los eluyentes de la fase móvil A y B en función del tiempo (Massieu et al. 1992). El gradiente de ambas soluciones se establece en la programación del flujo de las bombas (el equipo para determinar aminoácidos posee 2 bombas) y se representa en la tabla 7.

Tiempo (min.)	Flujo (ml/min.)	Fase A (%)	Fase B (%)
0.00	1.00	90 %	10 %
9.00	1.00	52 %	48 %
12.00	1.00	0 %	100 %
16.00	1.00	0 %	100 %
16.10	1.00	90 %	10 %
20.00	1.00	90 %	10 %
23.00	1.00	90 %	10 %

Tabla 7. Programa del gradiente en el análisis de aminoácidos, PCM/15xx.

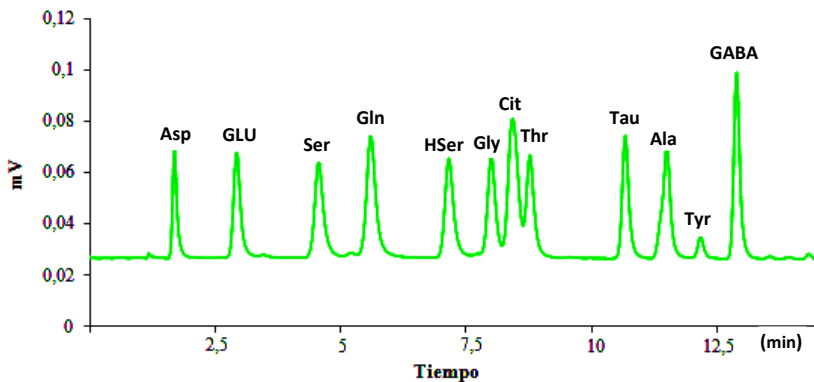
La fase móvil A consiste en una solución 95/5 (v/v) de tampón acetato sódico 50 mM (preparada a partir de una solución de acetato sódico 3 M) y metanol, a la cual se añaden 12.5 ml de alcohol isopropílico por litro de mezcla y se ajusta su pH entre 5,65 y 5,67 con NaOH y HCl. La solución B es una solución en 70/30 (v/v) de metanol y agua. Ambas son filtradas (filtro de 0.2 µm, Pall Corpotation, Port Washington, NY, EE.UU.) y desgasificadas por ultrasonidos según se comentó anteriormente, antes de ponerlas en el sistema cromatográfico.

Producto	Código	Casa comercial
Solución reactivo O-Phthaldialdehido	P 0532	Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
Metanol para cromatografía líquida	1.06035.2500	Merck, Whitehouse station, NJ, EE.UU
Acetato de Sodio (3 M)	S7899	Sigma, St. Louis, MO, EE.UU
Ácido clorhídrico	1.00316.1000	Merck, Whitehouse station, NJ, EE.UU
Hidróxido sódico	1.06498.1000	Merck, Whitehouse station, NJ, EE.UU
2-Propanol (alcohol isopropílico)	131090	Panreac, Barcelona, España

Tabla 8. Reactivos empleados en el análisis de aminoácidos por HPLC

La temperatura de la columna se mantiene constante a 40° C gracias a un horno (Waters TCM, Horno Waters) mejorando la velocidad de separación de los constituyentes de la muestra. El fluido pasa al detector de fluorescencia (Waters 474 Scanning Fluorescence) que posee alta sensibilidad y pone de manifiesto los solutos según van saliendo de la columna, determinando y midiendo aquellos compuestos que tengan fluorescencia (nativa o inducida por derivatización). El detector se encarga de la conversión de la señal analógica de los picos de salida (luminosa de 340 a 460 nm de longitud de onda), a digital. Los datos digitalizados son transmitidos al ordenador, donde serán integrados mediante el programa informático Empower (Empower Software, Waters, MA, EE.UU), diseñado para ello.

La identificación de los picos que componen el perfil de elución requiere la previa determinación de los tiempos de retención para cada aminoácido en idénticas condiciones a las del análisis de los aminoácidos en los experimentos. La identificación se realiza preparando una solución estándar de 50 µM para cada uno de los aminoácidos y determinando cada tiempo de retención. Posteriormente se prepara otra solución 50 µM con todos los aminoácidos y se comprueba que los picos del cromatograma coinciden con cada uno de los aminoácidos analizados por separado. Estos tiempos de retención permiten identificar y diferenciar cada uno de los aminoácidos.



Lectura de la muestra respecto al tiempo de elución en el que fueron tomados. El tiempo de retención de un soluto se toma como criterio de identificación del mismo.

Figura 2. Cromatograma o "perfil de elución" del patrón de aminoácidos

Abreviatura	Aminoácido	Código producto
Asp	Aspartato	A9256
GLU	Glutamato	G1251
Ser	Serina	S4500
Gln	Glutamina	G3126
Hser	Homoserina	H1001
Gly	Glicina	G7126
Thr	Treonina	T8625
Cit	Citrulina	C7629
Arg	Arginina	A5006
Tau	Taurina	T0625
Ala	Alanina	A7627
Tyr	Tirosina	T3754
GABA	Ácido Gamma-amino butírico	A2129

* Todos los reactivos fueron de la casa Sigma , St. Louis, MO, EE.UU

Tabla 9. Reactivos empleados como patrones de aminoácidos.

Se realiza una curva de calibrado previa al análisis para cuantificar la cantidad de aminoácido presente en una muestra. Se miden 6 concentraciones conocidas del aminoácido correspondiente como si se tratasen de muestras y el valor de la altura del pico de cada uno de las concentraciones del aminoácido se representa gráficamente en el eje de ordenadas, mientras que en el de abscisas se representa la concentración del aminoácido.

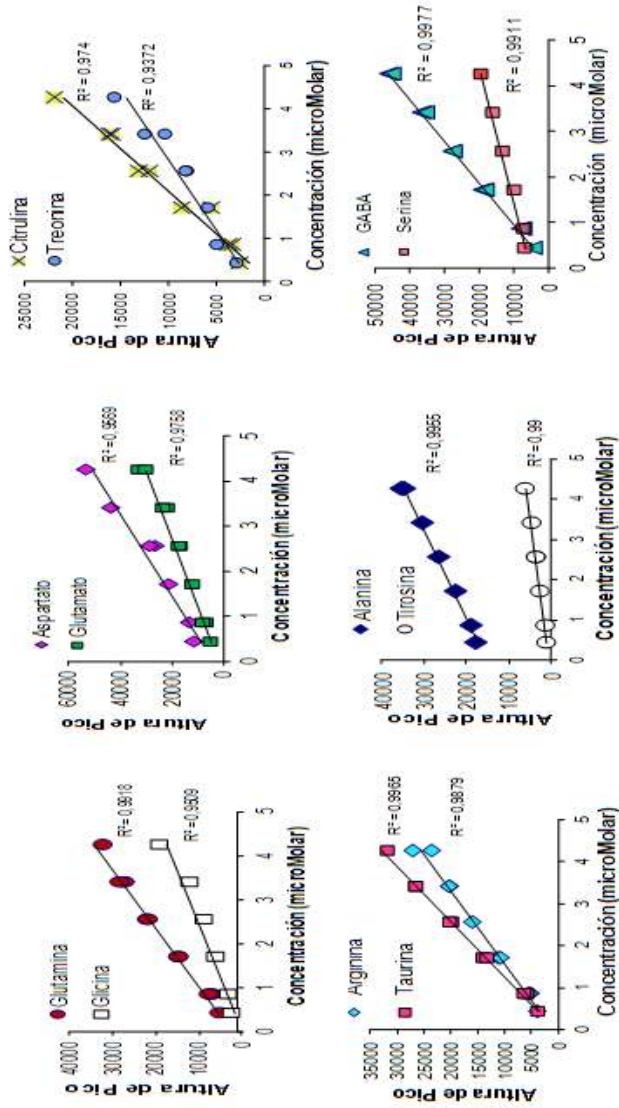


Figura 3. Curva de calibrado con los valores obtenidos a partir de la altura o del área del pico del cromatograma o "perfil de elución", para el cálculo de la concentración de los aminoácidos.

Estudio de catecolaminas por HPLC

El equipo para la determinación de las catecolaminas de las muestras, presenta varias novedades en comparación con el usado para las medidas de los aminoácidos. En primer lugar, la detección es “*on line*” de tal forma que la muestra según sale de la cánula pasa directamente al HPLC, en segundo lugar, no es necesario realizar la derivatización ya que las catecolaminas son detectadas electroquímicamente (por oxidación) y por último, no requiere de un gradiente en la fase móvil pues se obtiene una buena separación con una fase móvil lineal (Afonso et al. 1990, Rodríguez y Castro 1991).

Componentes	Nombre comercial
Inyector	Two-Position Six-Port Switching Valve
Desgasificador	Inline Degasser AF
Bomba	515 HPLC Pump
Columna	Symmetry C18 Column, 3,5 μm , 1,0 x 150 mm
Detector electroquímico	2465 Electrochemical Detector
Programa informático	Empower Software

* Water Chromatography Division, Milipore Corporation, Milford, MA, EE.UU.

Tabla 10. Componentes del equipo de HPLC para la determinación de Catecolaminas

Un microlitro cada 10 o 20 minutos (en función del experimento) del LCR que pasa por el capilar de recogida de la cánula de microdiálisis va directamente al inyector (Two-Position Six-Port Switching Valve; Waters, MA, USA) donde se mezcla con la fase móvil (tabla 11) al que previamente se le ha ajustado el pH a 3,5, se ha filtrado (0,45 μm), sonicado y desgasificado (In-line degasser AF; Waters). La fase móvil utilizada es una modificación de la que empleó en su artículo Shui y colaboradores para determinar catecolaminas por HPLC (Shui et al. 2000).

Producto	Código	Casa comercial
EDTA -ácido etilendiamino tetraacético (0.01%)	AC09651000	Scharlau, Barcelona, España
Trietilamina (0.25%)	T0886	Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.
Acetonitrilo (10%)	1.1429.2500	Merck, Whitehouse station, NJ, EE.UU
Acido 1-heptanosulfónico Monohidratado (0.525 gr / l)	AC12420025	Scharlau, Barcelona, España
Ácido ortofosfórico (70mM) H ₃ PO ₄	141032	Panreac, Barcelona, España
Agua bidestilada (MILLI-Q GRADIENT A10)	F1PN32771A	Merck-Millipore, Bedford, MA, EE.UU

Tabla 11. Reactivos empleados en la fase móvil del HPLC para determinar catecolaminas. Modificación del eluyente utilizado por Shui (Shui et al., 2000)

Tras atravesar la columna (Symmetry C18 Column, 3.5 µm, 1.0 x 150 mm; Waters, MA, USA) el fluido pasa al detector electroquímico (2465 Electrochemical Detector; Waters, MA, USA) con voltaje fijado en 0,3 V que pone de manifiesto los solutos a medida que salen de la columna, y donde se determinan y se miden aquellos compuestos que han sido oxidados. Los datos digitalizados, tras la conversión de la señal analógica por el detector, son transmitidos al ordenador en forma de cromatograma, donde son integrados por el programa informático Empower (Empower Software, Waters, MA, EE.UU).

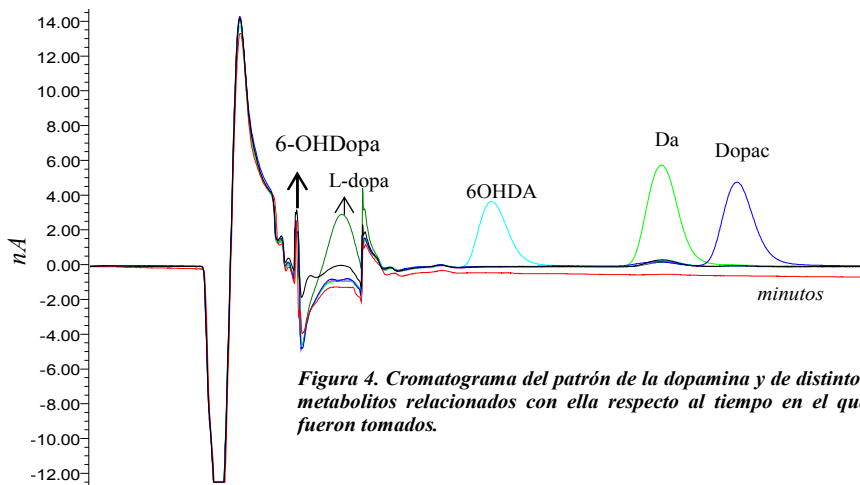


Figura 4. Cromatograma del patrón de la dopamina y de distintos metabolitos relacionados con ella respecto al tiempo en el que fueron tomados.

La identificación de los picos del cromatograma se realizó preparando soluciones individuales de 10µM para la dopamina (3-Hidroxitiramina) y para algunos de sus metabolitos, determinando así, los tiempos de retención para cada uno.

Producto	Código
DA, 3-Hidroxitiramina, Dopamina	H-8502
Dopac	D-9128
L-Dopa	D-9628
6-OHDA	H-4381

* Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.

Tabla 12. Reactivos empleados en la determinación de las catecolaminas.

ESTUDIO MORFOLÓGICO.

Obtención de muestras.

Al finalizar los experimentos y con el objetivo de extraer los cerebros, las ratas recibieron una sobredosis vía intraperitoneal de hidrato de cloral (Acofarma, Barcelona) al 8% (p/v) en una solución isotónica de NaCl al 0,9% (B. Braun Medical S.A., Barcelona) y fueron perfundidas transcárdialmente con 200 ml de solución salina 0,9% (B. Braun Medical S.A., Barcelona) y 400 ml de la solución de fijación, paraformaldehído (Panreac, Barcelona) al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M (pH 7.4). La conservación de la integridad del tejido y la apropiada consistencia que aporta al cerebro hacen que este fijador químico sea uno de los más usados. Una vez extraídos los cerebros se post-fijaron por inmersión en la misma solución de fijación durante 12 horas a 4°C. Transcurrido ese periodo, fueron sumergidos en una solución protectora de sacarosa (Panreac, Barcelona) al 30% (p/v) en PBS 0,1 M durante un mínimo de 48 horas a 4°C. Cuando los cerebros se hundían por haber incluido el máximo de sacarosa posible, eran cortados transversalmente en secciones de 30 µm de grosor en un micrótopo de congelación (Microm HM 450, Thermo

Scientific, MA., EE.UU.). Las secciones se recogieron en 7 series paralelas que fueron conservadas a -80°C en la misma solución de sacarosa (Panreac, Barcelona) al 30% hasta su uso.

Tanto el proceso inmunohistoquímico como el inmunofluorescente fueron realizados por el método de flotación o "free floating". En este método los cortes se procesan en recipientes donde el corte queda suspendido en los distintos reactivos que se van utilizando consecutivamente. Todas las incubaciones y lavados se hacen con agitación constante, en un agitador orbital. Este procedimiento asegura una reacción homogénea en todo el corte y una máxima penetración del anticuerpo, haciéndolo idóneo para cortes gruesos (> 20 micrómetros) como los de este caso.

Se realizaron controles para ambas técnicas, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, en donde se omitió el anticuerpo primario, dando como resultado marcaje negativo.

Inmunohistoquímica.

Los cortes histológicos tras ser descongelados y lavados varias veces en PBS 0,1 M, fueron tratados con una solución de H_2O_2 al 3% durante 30 minutos para desactivar las peroxidasas endógenas y evitar su interferencia durante el revelado posterior. Acto seguido, los cortes fueron varias veces lavados en PBS 0,1M e incubados durante una hora en la solución de bloqueo: 4% suero normal de cabra (NGS, Sigma) y 0.05% Tritón X-100 (Sigma) en PBS. La solución de bloqueo tiene la función de minimizar las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo con el tejido y facilitar la penetración del anticuerpo. Al término de la hora, las secciones fueron depositadas durante toda la noche y a temperatura ambiente, en una solución igual que la anterior, pero a la que se le había añadido el anticuerpo primario a la concentración correspondiente (véase tabla 14). Al día siguiente y tras varios lavados en PBS 0,1 M, los cortes se incubaron 2 horas con el anticuerpo secundario biotinilado apropiado (según se muestra en la tabla 15) y 1:200 NGS en PBS. Finalizado este tiempo, se volvieron a lavar las secciones con PBS 0,1M y se incubaron de 1 a 2 horas en extravidina-HRP en PBS 0,1 M. Seguidamente, se realizó el revelado añadiendo a los cortes una solución de diaminobencidina, H_2O_2 y tampón

cacodilato, que tras unos minutos (3-5 minutos) hizo visible la reacción inmunohistoquímica. Las secciones se volvieron a lavar en PBS 0,1 M y se montaron en portas gelatinizados donde se dejaron secar al aire y a temperatura ambiente. Una vez secos, los cortes fueron deshidratados pasando por alcoholes cada vez más concentrados (80, 90, 96, 100 %), se aclararon con xileno y se cubrieron con EUKITT (Panreac, Barcelona) y un cubreobjetos. Los cortes fueron examinados bajo el microscopio óptico (Leica DM2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzler, Alemania).

Producto	Cantidad	Código	Casa comercial
CINa	83 g/l	10604	Merck, Whitehouse station NJ, EE.UU.
NaH₂PO₄·H₂O	3.45 g/l	106346	Merck, Whitehouse station NJ, EE.UU
Na₂HPO₄·2H₂O	10.65 g/l	106580	Merck , Whitehouse station NJ, EE.UU
Agua destilada	1 litro		Merck-Millipore, Bedford, MA, EE.UU.

Tabla 13. Tampón fosfato salino o PBS 1M

Inmunofluorescencia.

El procesamiento general es similar al de la inmunohistoquímica, con la excepción de que no se inhiben las peroxidasas endógenas del tejido. Tras 60 minutos inmersos en la solución de bloqueo, los cortes permanecieron toda la noche en una mezcla de dos anticuerpos primarios (obtenidos de diferentes especies). Tras varios lavados en PBS 0,1 M, las secciones fueron incubadas durante 2 horas en anticuerpos secundarios frente a inmunoglobulinas de los huéspedes de los que se extrajeron los anticuerpos primarios, conjugados o con rodamina X red (emiten en longitud de onda del rojo-naranja a 590 nm) o bien, unidos a biotina en las concentraciones correspondientes (véase tabla 15) junto con 1:200 de NGS en PBS 0,1 M. Después de varios lavados en PBS 0,1 M y en caso necesario (al utilizar secundarios con biotina), se incubó durante 2 horas en una solución de estreptavidina unido al fluoróforo Cy2 (emite en la longitud de onda del verde, en 506 nm). En algunos estudios se marcaron los núcleos añadiendo a los cortes una solución 30 nM de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol, emite en azul a 455 nm) durante 1 minuto. Tras ser lavados varias veces en PBS 0,1 M, los cortes

fueron montados en portas gelatinizados, secados ligeramente en una cámara oscura, cubiertos con Vectashield (Vector Laboratories) y con un cubreobjetos. Para finalizar, el cubreobjetos fue sellado con esmalte transparente de uñas para preservar la muestra. Las secciones fueron examinadas en el microscopio de epifluorescencia (Leica DM2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzler, Alemania) o en el confocal (Olympus FV10-ASW2Q, Shinjuku, Tokio, Japón) mediante el uso de los filtros apropiados.

Anticuerpo primario

Producto	Antígeno al que reconoce/ Animal de procedencia	Concentración de uso/ Tipo de anticuerpo	Casa comercial
Anti-TH	Tirosina hidroxilasa / ratón	monoclonal/ 1:12000	T2928- Sigma, St. Louis, MO, EE.UU
Anti-TH	Tirosina hidroxilasa / conejo	policlonal/ 1:1000	T8700- Sigma, St. Louis, MO, EE.UU
Anti-GFAP	Proteína ácida fibrilar glial / conejo	policlonal/ 1:1000	G9269- Sigma, St. Louis, MO, EE.UU
Anti-GFAP	Proteína ácida fibrilar glial / ratón	monoclonal/ 1:800	MAB360-Chemicon (Millipore), EE.UU.
Anti-GLU	Aminoácido glutamato / conejo	policlonal/ 1:1000	MCA341GA-AbdSerotec, Kidlington, RU
Anti-NeuN	Proteína específica neuronal nuclear / ratón	monoclonal/ 1:600	MAB377-Chemicon (Millipore), EE.UU.
Anti-CD68	Macrosialin- microglía activada / ratón	monoclonal/ 1:1000	MCA341GA-AbdSerotec, Kidlington, RU
Anti-vGluT2	Transportador vesicular de glutamato isoforma 2 (tálamo) / ratón	monoclonal/ 1:600	MAB5504-Chemicon (Millipore), EE.UU.
Anti-CB	Calbindina / ratón	monoclonal/ 1:500	C9848- Sigma, St. Louis, MO, EE.UU

Tabla 14. Lista y concentraciones de anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo secundario/estruvidinas/otros reactivos

Producto/ Animal de procedencia	Concentración de uso/ Tipo de reactivo	Casa comercial
Biotina anti ratón/ cabra	1:1200/ anticuerpo 2°	115-065-003 / Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Pensilvania, EE.UU.
X red rhodamine anti conejo / cabra	1:3000/ anticuerpo 2°	111-295-144 / Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Pensilvania, EE.UU.
Cy2-streptavidina	1:200/ estreptavidina	016-220-084 / Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Pensilvania, EE.UU.
Dapi (4',6-Diamidino-2-Penilindol)	300nM	D1603 / Life Technologies, Carlsbad, California, EE.UU.
Triton X-100	0.05% / disolvente	X-100 / Sigma, St. Louis, MO, EE.UU
NGS (suero normal de cabra)	4% o 0.5% / bloqueante de uniones inespecíficas	G9023- Sigma, St. Louis, MO, EE.UU
ExtrAvidina® conjugada HRP (HRP:peroxidasa de rábano)	1:5000/ estreptavidina	E-2886 / Sigma, St. Louis, MO, EE.UU
DAB (diaminobencidina)	0.005% /	D-5637 / Sigma, St. Louis, MO, EE.UU

Tabla 15. Lista y concentraciones de anticuerpos secundarios, estruvidinas y otros reactivos utilizados.

Tinción de Nissl (violeta de cresilo)

Las secciones fueron lavadas en PBS 0.1 M y montadas en portas gelatinizados donde se dejaron secar en una estufa durante 48 horas. Tras este periodo de tiempo, los portaobjetos fueron sumergidos durante 15 minutos en violeta de cresilo, (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) al 0.5% y posteriormente aclarados durante 5 minutos con agua destilada. Seguidamente, los cortes histológicos fueron deshidratados sumergiéndolos durante 5 minutos en alcoholes (Panreac, Barcelona) de concentraciones crecientes, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%, y fueron aclarados durante 10 minutos en xileno (Panreac, Barcelona). Finalmente fueron cubiertos con EUKITT (Panreac, Barcelona) y con un cubreobjetos. Estos cortes fueron examinados bajo el microscopio óptico (Leica DM2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzler, Alemania).

Densitometría de las inervaciones al estriado

Para el estudio densitométrico de la inervación dopaminérgica alrededor de la cánula de microdiálisis se cuantificó la intensidad del marcaje para la TH (histoquímica biotina/DAB) en cubos de 200 alto x 200 ancho x 30 micras de espesor localizados a diferentes distancias de la cánula de

microdiálisis (fueron contabilizadas 49 áreas alrededor de la cánula). La densitometría fue realizada de acuerdo con los métodos mencionados previamente (Gonzalez-Hernandez et al. 2002; Gonzalez-Hernandez et al. 2004, Cruz-Muros et al. 2007) y mediante el uso del programa Image-Pro Plus (Medios de comunicación cibernética, Maryland, EE.UU.). Los valores de densitometría obtenidos en el estriado inyectado fueron normalizados como un porcentaje de los valores calculados para la misma región estriatal del estriado contralateral. La degeneración neuronal en la región circundante a la cánula de microdiálisis fue evaluada mediante inmunohistoquímica para NeuN.

La posible degeneración de las terminales sinápticas glutamatérgicas tálamo-estriatales y dopaminérgicas nigro-estriatales alrededor de la cánula de microdiálisis fue estudiada en los cortes mediante doble (NeuN+vGLU2 y NeuN+TH) y triple (DAPI+TH+vGLU2) marcaje inmunofluorescente con un microscopio confocal (Fluoview FV1000, Olympus).

Cuantificación neuronal.

Para el estudio de la degeneración retrógrada en el estriado, se realizó un recuento de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y de las neuronas glutamatérgicas talámicas en el cerebro ipsilateral y en el contralateral a la perfusión.

En el estudio de la posible degeneración retrógrada de las células DAérgicas se contabilizó el número de células TH+ en el mesencéfalo con la ayuda del programa Image-Pro Plus (Maryland, EE.UU.). Se cuantificó tres regiones correspondientes a las células de las áreas A8, A9 y A10 en seis cortes por rata y siguiendo los procedimientos de estudios anteriores (Gonzalez-Hernandez et al. 2004, Gonzalez-Hernandez et al. 2000, Rodriguez et al. 2001). El número de células contadas para cada región se refirió al cálculo para la misma región en el mesencéfalo contralateral. Así, de no haber degeneración de células, el porcentaje de células TH contadas en el mesencéfalo ipsilateral del estriado inyectado sería alrededor del 100%.

El estudio de la degeneración retrógrada de las células del tálamo se realizó contando el número de neuronas (células NeuN+) en los núcleos del tálamo que proyectan al estriado. Los núcleos talámicos estudiados fueron: el centrolateral (CL), el paracentral (PC), el paratenial (PT), el núcleo

parafascicular pars lateral (LPF), el central medial (CM) y el núcleo parafascicular de la pars medialis (MPF). El número de células contado en los núcleos del tálamo ipsilateral del lado del cerebro donde se perfundió el fármaco se normalizó como porcentaje del total de células contadas en los núcleos de ambos lados del cerebro. Si no hubiera degeneración celular, el porcentaje de células cuantificado en los núcleos intralaminares ipsilaterales al estriado inyectado sería alrededor del 50%.

Cuantificación de la reactividad astrocítica.

La respuesta de los astrocitos tras la perfusión de glutamato se evaluó comparando la inmunorreactividad estriatal al GFAP y al glutamato de los astrocitos próximos a la cánula con la observada en el estriado contralateral o en estriados perfundidos con el vehículo en la que se preparó la solución de GLU (LCR artificial). El promedio de la intensidad de la inmunofluorescencia del GFAP en un área (3000 voxels), se valoró en función de los procesos astrocíticos que mostraron la mayor señal de inmunofluorescencia. Mientras que la intensidad inmunofluorescente para el glutamato fue la contabilizada por defecto en estas mismas regiones astrocíticas. Al menos 2.000 procesos astrocíticos fueron cuantificados para cada tipo de célula astrocítica (protoplásmico y fibroso), para cada condición experimental (regiones con astrogliosis moderada y de astrogliosis severa para los astrocitos protoplasmáticos) y para cada lado del cerebro. Los cálculos se realizaron en áreas de 10 x 10 x 2 μm de grosor en imágenes con una resolución espacial de 1025 x 1025 píxeles y de una resolución de señal inmunofluorescente de 12 bits. La captura y el análisis de las imágenes se realizaron con el programa FV10-ASW (versión 01.07.01.00- Olympus Corporation).

Los datos fueron normalizados con los obtenidos en la misma región del estriado del lado contralateral del cerebro, siendo representados como porcentaje del valor medio calculado en los procesos astrocíticos del estriado contralateral. Para cada corte se calculó el mismo número de procesos astrocíticos en ambos lados del cerebro y para cada tipo de astrocito (astrocitos protoplásmicos y fibrosos).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron inicialmente evaluados mediante un análisis de varianza simple (one way ANOVA) seguido por el test LSD o Scheffé para comparaciones "post-hoc" múltiples. La comparación de frecuencia fue realizada mediante el test de χ^2 . Se utilizó para ello el programa Statistic (Statsoft; Tulsa, EE.UU.). Se utilizó un nivel de probabilidad $p < 0,05$ para asignar significación estadística.

EXPERIMENTOS: MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una vez descritos los Métodos Generales en el apartado anterior, y con objeto de facilitar la lectura de la parte experimental de esta Memoria de Tesis, se optó por hacer una descripción integrada del diseño y de los resultados obtenidos para cada experimento. Tomando en consideración el número y la diversidad de los experimentos realizados, creemos que esta modalidad descriptiva permitirá evitar el trasiego continuo entre distintas secciones de la Memoria facilitando, con ello, su lectura. Con el mismo objetivo, los experimentos serán agrupados en dos bloques temáticos, uno para los estudios realizados en el estriado y otro para los estudios realizados en la sustancia negra. Los estudios en el estriado están básicamente dirigidos a evaluar la posible acción tóxica del glutamato sobre las aferencias estriatales. Como se comentó en la Introducción, distintas evidencias sugieren que la enfermedad de Parkinson se inicia en el estriado y progresa de forma retrograda hacia la sustancia negra. Por tanto, el conjunto de experimentos que se presentarán en el primer bloque tiene como marco general el estudio de la actividad excito-tóxica del glutamato en el estriado, y su posible acción retrograda sobre las aferencias estriatales. El segundo bloque tiene objetivos similares, pero orientados hacia la sustancia negra. Aunque también se realizaron estudios de la excitotoxicidad glutamatérgica en este centro, no serán incluidos en la presente memoria. Los trabajos que se presentarán aquí son aquellos orientados a la evaluación de los mecanismos que median en la liberación glial de agentes neuroactivos con potencialidad neurotóxica o neuroprotectora. Por tanto, los estudios en la sustancia negra se centrará en la identificación de posibles mecanismos para la liberación glial de glutamato y de otros agentes neuroactivos. Para dar mayor fluidez a la lectura de la Memoria se adelantaron los aspectos específicos de la discusión de cada bloque temático al final de cada uno de ellos, y al final de cada experimento, cuando la amplitud o diversidad de los estudios tratados lo requieran.

BLOQUE TEMÁTICO 1: EXCITOTOXICIDAD GLUTAMATÉRGICA ESTRIATAL.

Introducción.

La excesiva liberación de glutamato es generalmente considerada como una causa directa de pérdida celular (excitotoxicidad) en trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Huntington (Albin et al. 1992, Douaud et al. 2009, Kassubek et al. 2005) o la enfermedad de Parkinson (Durante et al. 1995, Jenner y Olanow 1998, Martí et al. 2000, Meshul et al. 1999, Obrenovitch y Richards, 1995, Olanow y Tatton 1999, Rodríguez et al. 1998). Los procesos implicados en la captación astrocítica de glutamato (Bezzi et al. 1998, De Groot y Sontheimer 2011, Halliday y Stevens 2011, McGeer y McGeer 2008, Morales et al. 2009, Obrenovitch y Urenjak 1997, Rodríguez Díaz et al. 2005; Sofroniew y Vinters 2010) y en la posterior metabolización del aminoácido a moléculas de menos peligrosidad como la glutamina, la alanina y el α -cetoglutarato (Marcaggi y Attwell 2004, Sofroniew 2009, Sofroniew y Vinters 2010) son críticos para la prevención de la excitotoxicidad glutamatérgica. Sin embargo, se dan circunstancias en las cuales no resulta posible amortiguar el aumento extracelular de glutamato y donde los astrocitos muestran una modificación estructural progresiva (astroglisis reactiva), que podría alterar su papel neuroprotector (Raivich et al. 1999, Streit et al. 1999). Los astrocitos reactivos previenen la muerte neuronal mediante la recaptación de glutamato (McGeer y McGeer 2008; Teismann y Schulz 2004) y la liberación de productos neuroprotectores (como el factor neurotrófico derivado de la glía o el glutatión). Sin embargo, estos astrocitos también pueden liberar agentes tóxicos (especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, aminoácidos excitatorios...) que activan a las células microgliales (De Groot y Sontheimer 2011, Hazell 2007, McCarty 2006; McGeer y McGeer 2008, Rappold Tieu y 2010, Vesce et al 2007) e inducen la degeneración celular (Rappold y Tieu 2010, Sofroniew y Vinters 2010). Por lo tanto, la acción real de los astrocitos reactivos en la excitotoxicidad glutamatérgica es en la actualidad tema de discusión.

Estudios en rodajas de hipocampo (Xu et al. 2007) han mostrado una progresiva acumulación de glutamato en astrocitos expuestos puntualmente a una alta concentración de glutamato (acumulación auto-inducida de glutamato). Dado que el glutamato de los astrocitos puede ser liberado de forma repentina y masiva al medio extracelular (Xu et al. 2007), la acumulación auto-inducida de glutamato podría explicar la degeneración

neuronal que se observa en diferentes estados patológicos. Este podría ser el caso de la muerte celular observada en los alrededores de tumores cerebrales o en la zona de penumbra que rodea a las regiones cerebrales que han sufrido un ictus (de Groot y Sontheimer 2011, Hazell 2007). Partiendo de la idea inicial de que, de demostrarse la existencia de la acumulación auto-inducida de glutamato en los ganglios basales, en centros como el estriado podría ser útil para explicar la degeneración de las neuronas (André et al 2010; Beal et al. 1986, Beal et al. 1988, Coyle 1987, Coyle y Schwarcz 1976, McGeer et al. 1978) y las células gliales (Haas y Erdo 1991, Matute, 1998, Matute et al. 2006, McDonald et al. 1998, Yoshioka et al. 1995) observada en diferentes trastornos de los ganglios basales como la enfermedad de Huntington y de Parkinson (André et al. 2010, Halliday y Stevens 2011, Marcaggi y Attwell 2004, Obeso et al. 2010, Rappold Tieu y 2010). Como ya se comentó en la Introducción, el estriado soporta una gran cantidad de aferencias glutamatérgicas procedentes principalmente de la corteza cerebral y del tálamo. Además, se ha evidenciado que este centro dispone de astrocitos capaces de liberar glutamato en distintas condiciones (Del Arco et al. 2003, Obeso et al. 2008, Rodríguez Díaz et al. 2005). Por tanto, el estriado dispone de las condiciones idóneas para que la acumulación auto-inducida de glutamato pueda tener lugar.

En los siguientes 3 experimentos se examinó "*in vivo*" la posible acumulación auto-inducida de glutamato en los astrocitos del estriado, y se evaluó su posible acción tóxica. Para ello se perfundió glutamato en el medio extracelular del estriado mediante microdiálisis inversa, un procedimiento que permite minimizar los efectos inespecíficos de la administración de agentes químicos en el tejido cerebral.

Experimento 1: Efecto inespecífico de la cánula en el estriado.

❖ Metodología.

A pesar de que los estudios de administración de glutamato estriatal por microdiálisis reversa es un procedimiento que induce un bajo daño local durante la introducción de la cánula (cánula de 220 μm de diámetro y con 4mm de superficie de intercambio para estriado, se introdujo a una velocidad de 500 o 100 micras por minuto) y durante la perfusión de las soluciones (la administración de agentes químicos se realiza a través de membrana y con una transferencia de volumen mínima) (Rodríguez et al. 2006), el primer

experimento fue orientado al estudio de las acciones inespecíficas de esta técnica. En este experimento se utilizaron 8 ratas anestesiadas con equitensín, a las cuales se les perfundi6 ringer durante una hora tras la colocaci6n de la c6nula en el estriado, para posteriormente (1 o 6 semanas despu6s) ser perfundidas transcordialmente con 200 ml de salino 0,9 % de cloruro s6dico con heparina seguido de 400 ml de paraformaldehido (PFA) al 4% en PBS 0,1 M para realizar una correcta fijaci6n del tejido. Tras 12 horas sumergido el cerebro extraído en PFA, fue depositado en una soluci6n crioprotectora al 30% de sacarosa en PBS durante 48 horas (tiempo suficiente para que la pieza incluya sacarosa hasta saturaci6n). El cerebro fue seguidamente enfriado hasta la congelaci6n (-80° C) y posteriormente cortado en rodajas en el eje transversal de 30 micras de grosor en un micr6tomo de congelaci6n. La localizaci6n de la c6nula en el estriado se realiz6 mediante la tinci6n de violeta de cresilo y la evaluaci6n del daño tisular inespecífico se determin6 mediante microscopía confocal utilizando los siguientes marcadores inmunohistoquímicos: el anticuerpo contra CD68 para observar la activaci6n microglial, el anticuerpo contra GFAP para evidenciar la activaci6n astrocítica, y los anticuerpos contra NeuN y calbindina para evaluar el daño neuronal.

Los astrocitos se consideraron de tipo fibroso si estaban localizados en las zonas de tractos del estriado y si poseían procesos largos y delgados paralelos a las fibras de los tractos (Raivich et al. 1999), y los astrocitos protoplásmicos eran aquellos que se encontraban ubicados en la sustancia gris y que mostraban numerosos procesos cortos y muy ramificados con muchas extensiones membranosas.

❖ Resultados

A lo largo del tracto generado por la inserci6n de la c6nula (véase células microgliales CD68+ en la figura 5.1) se localiz6 una pequeña lesi6n rodeada de una astrogliosis moderada (compárese figuras 5.4 y 5.3). La astrogliosis s6lo fue observada en los astrocitos protoplásmicos y fibrosos situados en las inmediaciones m6s pr6ximas al tracto de la c6nula (figuras 4.5 y 5.7). Ocasionalmente, fueron observados algunos procesos radiales (véase flechas azules en la figura 5.5) de forma esporádica (compárese con los procesos radiales inducidos por glutamato que se comentarán luego junto con los de la figura 5.5) en los bordes de la lesi6n. La inmunohistoquímica para

glutamato se marcó con intensidad en la microglía reactiva que ocupaba la cavidad originada por la cánula de microdiálisis (figura 5.2), pero fue débil o inexistente en los astrocitos que la rodeaban (flechas amarillas en la figura 5.6). El glutamato se marcó (la figura 5.10 muestra la inmunorreactividad para el glutamato alrededor de neuronas calbindina+ mostradas en la figura 5.9) en las terminales sinápticas alrededor de las neuronas estriatales con intensidad media superior a la observada en los astrocitos (flechas rosas en las figuras 5.6 y 5.8).

Este experimento inicial mostró que la microdiálisis induce un efecto inespecífico pequeño, lo cual resultó muy conveniente para la realización de los estudios ulteriores.

Acción inespecífica de la microdiálisis en astrocitos y microglía

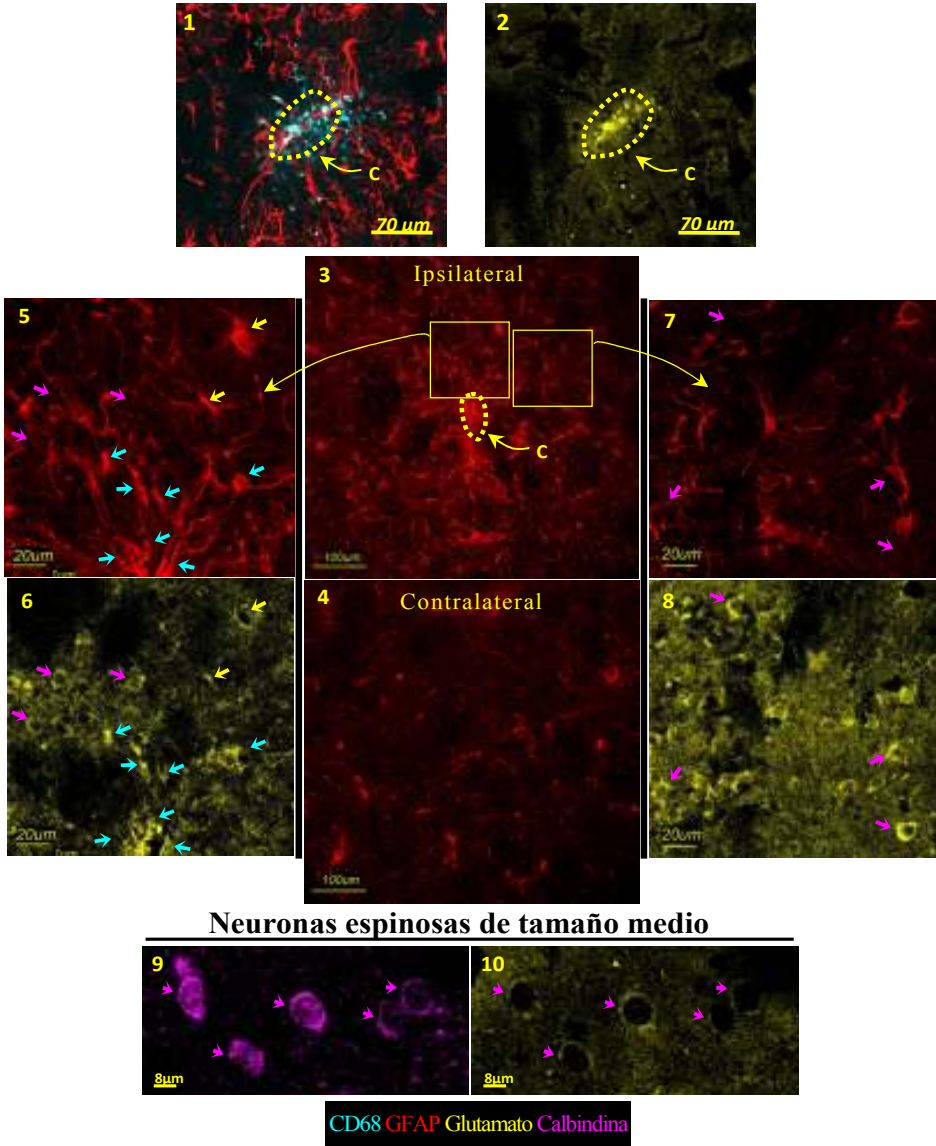


Figura 5. Efecto inespecífico de la cánula de microdiálisis en los astrocitos y en la microglía. Vista axial de las células microgliales (en azul se muestra la inmunorreactividad para el CD68 en imagen 1), astrocitos (en rojo se muestra la inmunorreactividad GFAP en 1, 3, 4, 5 y 7), y las neuronas (se muestra en color rosa la inmunorreactividad para calbindina en el 9). El glutamato se muestra en amarillo. Se muestra la acumulación de glutamato: en la microglía en el 2, en las neuronas en el 6, 8 y 10 (flechas de color rosa) y en los astrocitos en el 6 y 8 (flechas amarillas para los astrocitos y las flechas azules para los procesos radiados). C: región central por donde entró la cánula de microdiálisis.

Experimento 2: Acción estriatal del glutamato extracelular extrasináptico.**❖ Metodología.**

El objetivo del estudio fue evaluar la acción del glutamato extracelular extrasináptico en las distintas poblaciones celulares del estriado. Para ello, 4 grupos de 8 ratas (dos grupos 0.5 mM de glutamato, donde el primer grupo fue sacrificado a la semana de la perfusión y el otro a las 6 semanas, y otros dos grupos con 5 mM de glutamato, uno de 1 semana y el otro de 6 semanas) fueron perfundidas con una solución ringer (LCR artificial) basal iso-osmolar (285 mOsm) durante 150 minutos, y luego con una solución ringer iso-osmolar que contenía glutamato a una concentración de 0.5 o de 5 mM de glutamato durante 60 minutos. Una semana o seis semanas después, las ratas fueron anestesiadas y perfundidas con el mismo protocolo utilizado en el experimento anterior (y descrito de forma más pormenorizada en la parte general de Material y Métodos). Finalmente se practicaron distintos estudios inmunohistoquímicos mediante microscopía confocal con los siguientes marcadores: anticuerpo monoclonal para la proteína ácida fibrilar glial (anti-GFAP) de ratón, anticuerpo monoclonal anti-macrosialin (anti-CD68) de ratón, anticuerpo policlonal para la proteína ácida fibrilar glial (anti-GFAP) de conejo, anticuerpo policlonal contra glutamato (anti-GLU) de conejo, anticuerpo monoclonal anti-calbindin (anti-calbindin) de ratón, y anticuerpo monoclonal contra la proteína específica neuronal nuclear (anti-NeuN) de ratón.

Se evaluó la reacción astrocítica originada por la administración del glutamato comparando la inmunoreactividad del GFAP y del glutamato en el estriado perfundido con glutamato con la inmunoreactividad de la GFAP y del glutamato en el estriado perfundido sólo con el vehículo (ringer), según el procedimiento descrito en la sección de Material y Métodos. Con el fin de minimizar las diferencias debidas a variaciones en las condiciones del protocolo durante el procesamiento de los tejidos y en el análisis, todas las secciones fueron procesadas simultáneamente usando los mismos protocolos y reactivos químicos, y manteniendo todos los parámetros microscópicos y del ordenador constantes durante todo el estudio. Debido a que, incluso en estas condiciones, las variables puede sufrir fluctuaciones entre ensayos inmunohistoquímicos, los datos fueron normalizados con los obtenidos en la misma región del estriado contralateral y representados como un porcentaje

del valor medio calculado en los procesos astrocíticos del estriado contralateral. En cada imagen (estriado ipsilateral y contralateral a la cánula) se utilizó el mismo número de procesos astrocíticos. Se realizaron estos cálculos haciendo distinción entre los astrocitos protoplasmáticos y los fibrosos. La posición y los límites de las zonas de tractos en el estriado fueron localizados con el microscopio de contraste de fase (imágenes mostradas en blanco y negro en las distintas figuras). La inmunorreactividad del GFAP y del glutamato de los astrocitos protoplásmicos se calculó para 2 regiones por separado, la región con astrogliosis moderada y la región con astrogliosis severa. De acuerdo con estudios previos (Sofroniew y Vinters 2010), la astrogliosis de una región fue considerada como moderada si los astrocitos se encontraban hipertróficos, con una alta inmunorreactividad para el GFAP (comparándolo con los astrocitos del estriado contralateral) y si sus procesos no presentaban superposición con los procesos de los astrocitos vecinos (sin interrupción de los dominios celulares individuales). La astrogliosis fue considerada como severa si sus astrocitos mostraban una marcada expresión de GFAP, hipertrofia y superposición de procesos astrocíticos con interrupción del dominio celular individual.

❖ Resultados

La perfusión de glutamato indujo una pérdida completa de astrocitos protoplásmicos, astrocitos fibrosos y neuronas en la región estriatal que bordea el área de perfusión. Esta pérdida celular fue observada en un radio de unos 400 μm alrededor de la cánula de microdiálisis, lo que sugiere que la degeneración celular es dependiente de la concentración de glutamato en el medio extracelular. Se ha propuesto la existencia de dos reservorios de glutamato extracelular en el cerebro, un reservorio neurotransmisor ligado a una acción rápida y breve del glutamato sináptico sobre los receptores glutamatérgicos perisinápticos, y un reservorio neuromodulador ligado al glutamato glial, el cual después de ser liberado por los astrocitos difunde por el espacio extracelular donde induce una acción prolongada sobre receptores glutamatérgicos de una zona extensa (Bezzi et al. 2004, Del Arco et al. 2003, Keefe et al. 1993, Lowy et al. 1993, Saulskaya y Marsden 1995, Shinohara et al. 2000, Tucci et al. 1998). La tasa de transferencia de las sustancias inyectadas a través de la membrana de la cánula de microdiálisis (10-15% según los estudios practicados “*in vitro*” antes de cada experimento) sugiere que la perfusión de 5 mM de glutamato aumentó la concentración de

glutamato extracelular en más de 500 μM , una concentración que se reduce rápidamente por la acción de los transportadores gliales de glutamato. Esta concentración es más de 10 veces inferior a la existente en las hendiduras sinápticas durante la neurotransmisión (3-5 mM), pero más de 100 veces superior a la observada en el espacio extrasináptico (1-2 μM). De este modo, la perfusión de glutamato puede ser capaz de incrementar el reservorio glutamatérgico no sináptico pero no el sináptico, sugiriendo que las acciones del glutamato perfundido involucran a los receptores de glutamato ligados a la neuromodulación más que a la neurotransmisión.

La perfusión de glutamato también indujo una marcada astrogliosis reactiva en el estriado, respuesta que se fue reduciendo progresivamente en las zonas más alejadas de la región de perfusión. Se identificaron tres regiones concéntricas alrededor de la cánula de diálisis, la región central (C), la región proximal (P) y la región distal (D). En la región C por donde penetró la cánula no se observaron astrocitos (C en la figura 6.1). En la región P circundante a C (P en la figura 6.1) fueron observados procesos capsulares GFAP+, y a los que nos referiremos como procesos escarificados (véanse las flechas amarillas en las figuras 6.3 y 6.5). En la región P también fueron observados procesos radiados largos y delgados GFAP+ que se extendían perpendicularmente a la región por donde la cánula penetró y que denominaremos procesos radiados (véase la figura 6.2 y las flechas verdes en las figuras 6.4 y 6.5). De forma ocasional los procesos escarificados hacían contacto con los procesos radiados (véase la figura 6.5) sugiriendo que ambos pertenecen al mismo tipo celular. Teniendo en cuenta que los procesos radiados eran mucho más evidentes que los procesos escarificados, estas células GFAP+ fueron denominadas células tipo-radial. Un hallazgo interesante fue la falta de astrocitos protoplásmicos y fibrosos en la región P (compárense las figuras 6.13 y 6.15).

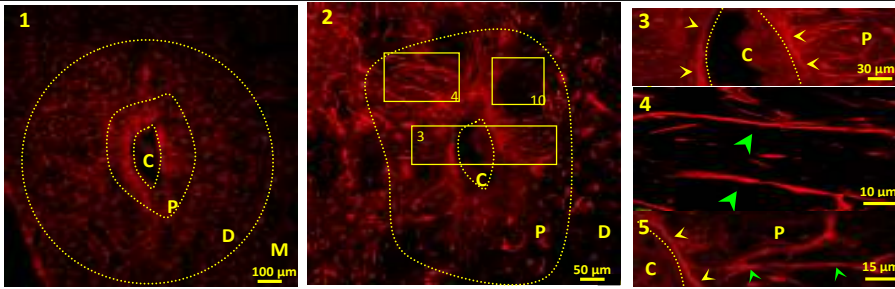
El tejido situado en las regiones circundantes a la región P (región D distal en la figura 6.1) mostró una clara astrogliosis reactiva para los astrocitos protoplásmicos y fibrosos. Los astrocitos protoplásmicos se encuentran en la sustancia gris (fuera de las líneas discontinuas en las figuras 6.6 a 6.9), mostrando una expresión mucho más marcada de GFAP en la región P del estriado inyectado que en el mismo lugar del estriado contralateral (véanse las figuras 6.7 y 6.9), o que en el estriado ipsilateral de la perfusión control. La densidad de los astrocitos protoplásmicos en el parénquima estriatal fue mayor en las zonas de la región D más cercanas a la región P. En estas zonas los astrocitos presentaban la pérdida de los dominios celulares individuales

que caracteriza a la astrogliosis reactiva severa (figura 6.10). Aunque las células astrocíticas de las zonas más periféricas de las regiones P mostraron una alta inmunorreactividad GFAP, su densidad en el parénquima estriatal fue normal y con sus dominios individuales preservados (astrogliosis reactiva moderada, véase figura 6.11). Los astrocitos fibrosos también mostraron hipertrofia y alta inmunorreactividad GFAP en la región D (compárense las figuras 6.17 y 6.19). Finalmente, las zonas estriatales más alejadas de la zona perfundida (a partir de 0.7-1.5 mm de la región central C) presentaron células astrocíticas protoplásmicas y fibrosas con una estructura y expresión GFAP similares a la de los astrocitos del estriado contralateral no perfundido (región marginal M en la figura. 6.1).

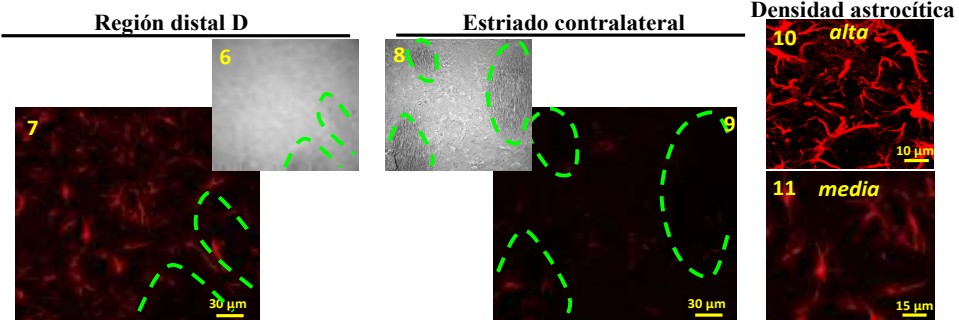
El fenómeno más interesante inducido por la perfusión de glutamato fue la marcada acumulación del aminoácido observada en los astrocitos de la región C y P. En la región C, la acumulación de glutamato se muestra en las figuras 7.5, 7.7 y 8.13. En la región P (figura 7.2), tanto los procesos radiales (figuras 7.8 y 7.9) como los escarificados (figuras 7.4-7.7) mostraron una marcada inmunorreactividad para el glutamato. Esta alta inmunorreactividad para el glutamato fue también observada en los astrocitos protoplásmicos (figuras 7.10 y 7.11) y fibrosos (figuras 7.12 a 7.14) de la región D. Con objeto de cuantificar este fenómeno, los valores de inmunorreactividad fueron normalizados con los datos promedios calculados para la misma región del estriado contralateral. En la parte superior de la figura 8 se muestra un ejemplo (con diferentes aumentos) de la inmunorreactividad de glutamato en los astrocitos protoplásmicos del lado del cerebro perfundido con glutamato (lesión) con respecto al estriado contralateral. La perfusión de glutamato indujo un aumento marcado de la inmunorreactividad al GFAP en los astrocitos protoplásmicos (figura 8.8 vs. 8.9, y la figura 8.10 vs 8.11) y fibrosos (figura 8.27 vs 8.30), un efecto que fue mucho más acusado que el observado en las ratas control perfundidas sólo con LCR (véanse las figuras 8.18 y 8.32). Tanto el soma como los procesos astrocíticos mostraron alta inmunorreactividad glutamatérgica, un efecto que fue observado en los astrocitos protoplásmicos (compárense con la figura 8.14 vs 8.15 y la figura 8.16 vs 8.17) y fibrosos (figura 8.28 vs 8.31) de los animales perfundidos con glutamato, pero no en los astrocitos de los animales control (Figs. 5.19 y 5.33). Por ello, mientras que la inmunorreactividad glutamatérgica en el estriado no perfundido fue encontrado principalmente en la inervación glutamatérgica de las neuronas estriatales (inmunorreactividad más marcada

que la observada en astrocitos) (véase las flechas rojas en la figura 7.16), la inmunorreactividad para el glutamato en el estriado perfundido con una solución de glutamato fue observada principalmente en los astrocitos (véase las flechas verdes en la figura 8.17) (figura 8.5). Tanto la inmunorreactividad para el GFAP (figura 8.24) como para el glutamato (figura 8.25) fue más marcada en la región D con astrogliosis severa que en la región D con astrogliosis moderada (véase la figura 8.20 vs 8.21, y la figura 8.22 vs 8.23). No fue posible realizar comparaciones similares para la glía tipo-radial, debido a que estas células de la región P del estriado perfundido con glutamato sólo fueron observadas ocasionalmente en el estriado con perfusión control, y no fueron observadas en el estriado contralateral a la inserción de la cánula de microdiálisis.

Glía en forma radial



Astroцитos protoplásmicos



Astroцитos fibrosos

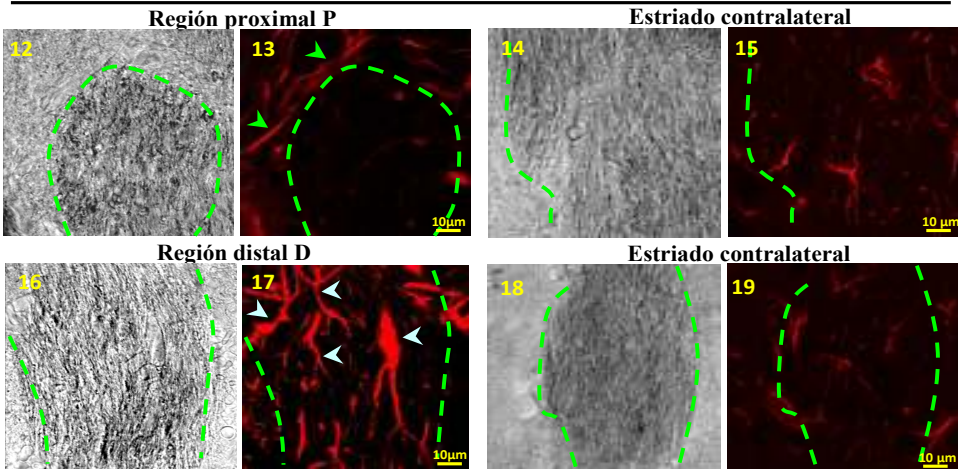


Figura 6. Vista axial de la gliosis reactiva alrededor de la zona de inserción de la cánula de microdialísis después la perfusión de glutamato. Las imágenes en rojo muestran la inmunorreactividad de GFAP en la glía de tipo radial (arriba), en los astroцитos protoplásmicos (centro) y en los astroцитos fibrosos (abajo). Las imágenes en blanco y negro muestran la distribución de las fibras en tractos del estriado (líneas negras rodeadas con líneas verdes discontinuas) en el parénquima estriado (blanco). C: región central por donde penetró la cánula de microdialísis. P: región proximal donde se muestran los procesos radiales (puntas de flecha de color verde) y los procesos de escarificación (puntas de flecha de color amarillo). D: región distal que muestra astroцитos protoplásmicos y astroцитos fibrosos (puntas de flecha azul). La región P muestra una carencia de astroцитos protoplásmicos y fibrosos (compárese las imágenes 13 y 15), pero posee procesos GFAP dispuestos a modo de cápsula alrededor de la región C (puntas de flecha amarillas en 3 y 5) y procesos radiados GFAP que se extienden perpendicularmente a los procesos que constituyen la cápsula (puntas verde de flecha en las imágenes 4 y 5) y que en ocasiones contacta directamente con ellos (5). La región D mostró una marcada astrogliosis protoplásmica reactiva (fuera de las líneas discontinuas en las figuras. 7 y 9) y en astroцитos fibrosos (dentro de las líneas discontinuas en imágenes 7 y 9). La densidad de los astroцитos protoplásmicos fue mayor en las zonas de la región D más cercanas a la región P, donde se observó una interrupción en sus dominios individuales (10). Los astroцитos fibrosos mostraron también hipertrofia y una marcada inmunorreactividad para GFAP en la región D (imágenes 17 vs 19).

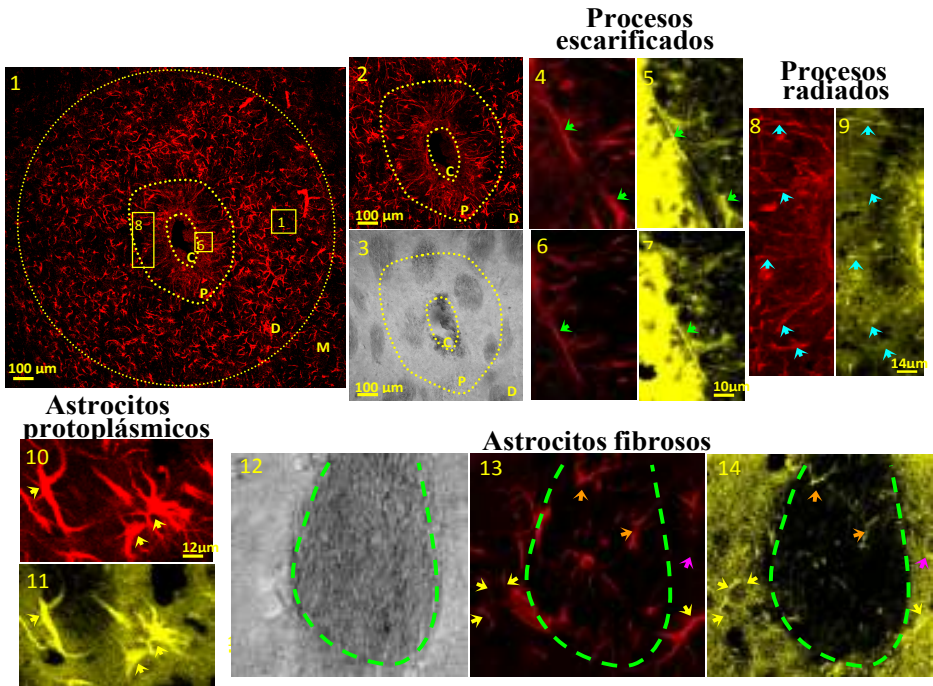
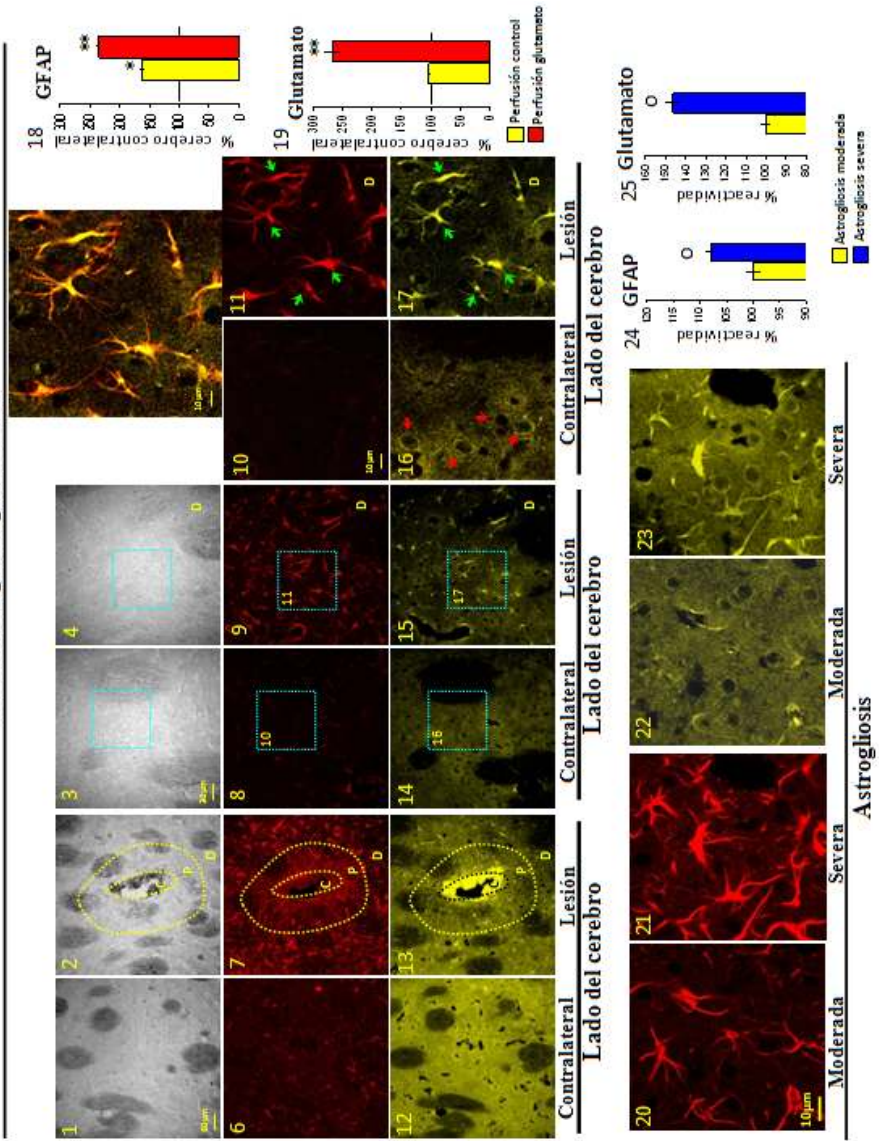


Figura 7. Vista axial de la astrogliosis reactiva y de la acumulación activa de glutamato alrededor de la zona de inserción de la cánula de microdiálisis después de la perfusión de glutamato. La inmunoreactividad de las células para el GFAP se muestra en rojo y para el glutamato en pseudo-color amarillo. Las imágenes en blanco y negro muestran la distribución de las fibras en tractos en el estriado (líneas negras rodeadas de líneas discontinuas verdes). C: región central, por donde penetró la cánula de microdiálisis. P: región proximal mostrando procesos radiales (flechas verdes) y procesos de escarificación (flechas amarillas). D: región distal que muestra astrocitos protoplásmicos y astrocitos fibrosos (flechas azules). Procesos de escarificación: flechas verdes. Procesos radiales: flechas azules. Astrocitos protoplásmicos: flechas amarillas. Astrocitos fibrosos: flechas de color naranja. Se encontró una acumulación marcada de glutamato en la región C (lado izquierdo de las figuras 5 y 7). Tanto los procesos radiados (figuras 8 y 9) como los escarificados (figuras 4 a 7) mostraron una marcada inmunoreactividad para el glutamato. Se observó una alta inmunoreactividad también para el glutamato en astrocitos protoplásmicos (figuras 10 y 11) y en astrocitos fibrosos (figuras 12 a 14) de la región D.

Astrocytos protoplásmicos



Astrocitos fibrosos

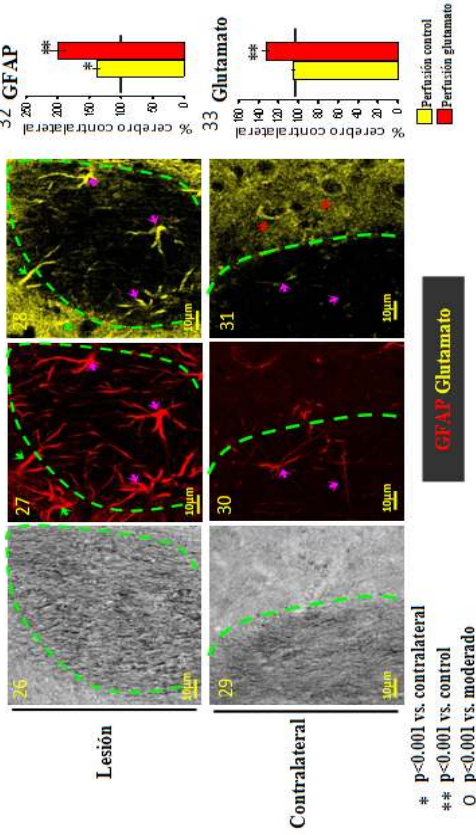


Figura 8. Astroglisis reactiva y acumulación de glutamato tras la perfusión activa de glutamato: las diferencias entre el estriado perfundido contralateral, el perfundido con el vehículo y el estriado perfundido con la solución de glutamato. La inmunoreactividad de las células para GFAP se muestra en rojo y para el glutamato en amarillo. Las imágenes en blanco y negro muestran la distribución de las fibras en tramos en el estriado (líneas negras rodeadas por las líneas discontinuas verdes). C: región central, por donde penetró por la cápsula de microdialisis. P: región proximal donde se muestran los procesos radiales (flechas verdes) y los procesos escarificados (flechas amarillos). D: región distal donde se observan astrocitos protoplásmicos y astrocitos fibrosos (flechas azules). Astrocitos protoplásmicos: flechas verdes. Astrocitos tipo radial: flechas de color rosa. Inervación neuronal glutamatérgica: flechas rojas. Ejemplos de inmunohistoquímica marcada para GFAP y glutamato en astrocitos protoplásmicos (arriba) y en astrocitos fibrosos (abajo). La perfusión de la solución de glutamato induce un aumento notable de la inmunoreactividad para GFAP en los astrocitos protoplásmicos (8 frente a 9, y 10 vs 11) y fibrosos (27 vs 30), efecto que fue mucho más acusado que en ratos control (18 y 32). Ambos astrocitos, protoplásmicos (14 vs 15, y 16 vs 17) y fibrosos (28 vs 31) mostraron una fuerte inmunoreactividad para el glutamato, efecto no observado en los animales control (19 y 33). La inmunohistoquímica para GFAP y para el glutamato mostró una colocación marcada en los astrocitos (5). La inmunoreactividad para el GFAP (24) y el glutamato (25) fue mayor en las regiones con astroglisis severa (caracterizada por una hipertrofia GFAP y la superposición de los procesos con pérdida de los dominios astrocíticos, 21 y 23) que en las regiones con astroglisis moderada (con menor hipertrofia GFAP y sin superposición de los procesos astrocíticos ni de la pérdida de los dominios astrocíticos, 20 y 22). Los valores de inmunoreactividad (intensidad inmunofluorescente) obtenidos en el estriado inyectado se normalizaron como porcentaje del valor medio calculado para los procesos astrocíticos del estriado contralateral, un procedimiento que se utilizó para minimizar la fluctuación entre los ensayos de inmunohistocin. Los valores representan la media ± error estándar.

Sólo una porción de la astrogliosis reactiva que acumuló glutamato una semana después de la administración de la solución de glutamato, se mantuvo durante las 6 semanas del estudio. Las células gliales tipo-radial (procesos escariformes + procesos radiales) desapareció por completo seis semanas después de la administración de glutamato. La región P ocupada previamente por la glía radial presentó a las 6 semanas (figuras 9.1 y 9.2) astrocitos protoplásmicos (véase las zonas del estriado de la región C en las figuras 9.2 y 9.3). Además, el parénquima estriatal alrededor de la región C perdió todas las neuronas (véase estriado alrededor de la región C en las figuras 9.6 y 9.7). Por lo tanto, la región P ocupada por la glía radial durante la primera semana después de la inyección (y que mostró una pérdida completa de las neuronas) presentó luego una reposición de astrocitos protoplásmicos. Por ello, 6 semanas después de la perfusión de glutamato, el límite entre P y D fue identificado por la ausencia de neuronas en la región P y por la presencia de neuronas en la región D. Los astrocitos protoplásmicos permanecieron hipertróficos y con una expresión alta de GFAP, y fueron localizados tanto en la región P como en la D. No se observaron diferencias astrocíticas claras entre las regiones P y D (véase la figura 9.3 vs 9.4).

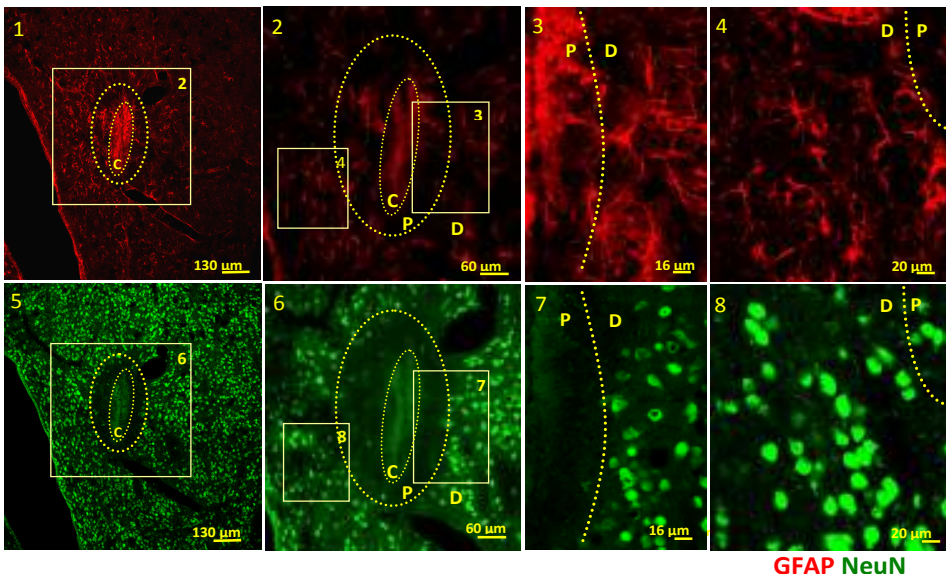
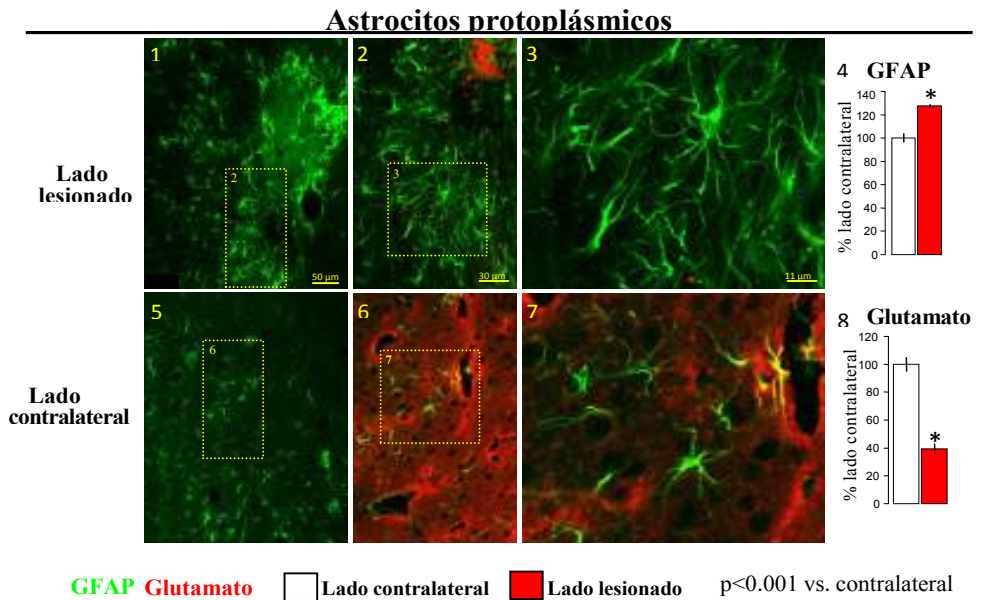
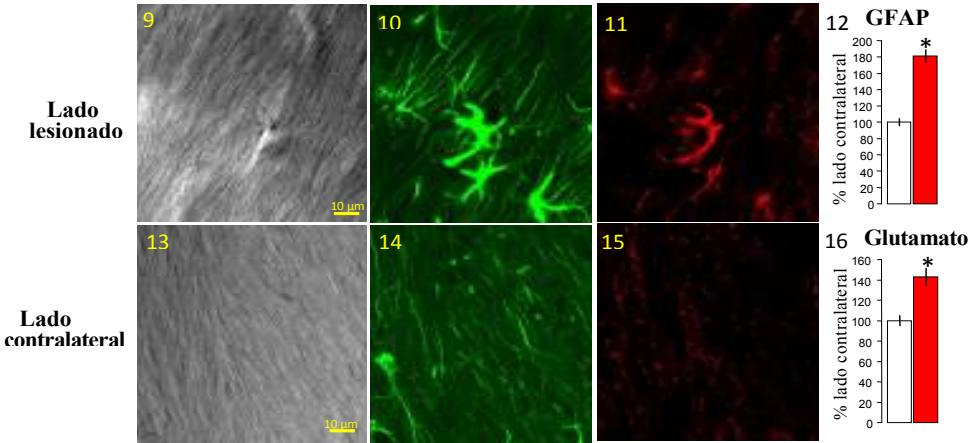


Figura 9. Gliosis reactiva y degeneración neuronal después de la perfusión de glutamato: efectos a largo plazo. La inmunorreactividad de las células se muestra en rojo para GFAP y en verde para NeuN. C: región central, por donde se introdujo la cánula de microdialisis. P: región proximal. D: región distal. La glía tipo radial ha desaparecido por completo a las seis semanas después de la perfusión de la solución de glutamato. La región P previamente ocupada por glía tipo radial es posteriormente ocupada por astrocitos protoplásmicos (1, 2, 3). El parénquima estriatal alrededor de la región C ha perdido todas sus neuronas (5, 6, 7). Los astrocitos protoplásmicos se mantuvieron hipertróficos en las regiones P y D. No se observaron diferencias astrocíticas entre las regiones P y D (3 vs. 4).

A pesar de la persistencia de la alta inmunorreactividad para GFAP encontrada en astrocitos protoplásmicos a las 6 semanas después de la administración de glutamato (figura. 10.4), la inmunorreactividad de glutamato en estas células disminuyó hasta valores incluso inferiores a los calculados para los astrocitos del estriado contralateral (figura. 10.8; véanse las figuras 10.3 y 10.7). Por el contrario, los astrocitos fibrosos presentaron en estos estadios tardíos (6 semanas después de la administración de glutamato) una alta inmunorreactividad tanto para el GFAP (figura 10.12 y compárese con las figuras 10.10 y 10.14), como para glutamato (figuras. 10.16 y comparar las figuras 10.11 y 10.15).



Astrocitos fibrosos



GFAP Glutamate □ Lado contralateral ■ Lado lesionado $p < 0.001$ vs. contralateral

Figura 10. Gliosis reactiva y acumulación de glutamato tras la perfusión activa de glutamato: efectos a largo plazo. Se muestra la inmunorreactividad de las células para GFAP en verde y para glutamato en rojo. Las imágenes en blanco y negro muestran la distribución de fibras en los tractos del estriado. En los astrocitos protoplásmicos, la alta inmunorreactividad para GFAP persistió 6 semanas después de la administración de glutamato (1 vs 5; 2 vs 6; 3 vs 7, 4), sin embargo, la inmunorreactividad para el glutamato disminuyó a valores por debajo del nivel del estriado contralateral (8). En los astrocitos fibrosos, la alta inmunorreactividad para GFAP (10 vs 14, 12) y glutamato (11 vs 15; 16) persistió 6 semanas después de la administración de glutamato. Los valores son la media \pm error estándar de la intensidad de la inmunofluorescencia (los valores se normalizaron como porcentaje del valor medio del estriado).

Experimento 3: Acción del glutamato extracelular extrasináptico estriatal sobre el metabolismo glial del glutamato.

❖ Metodología.

El objetivo del estudio fue evaluar la acción del aumento del glutamato extracelular extrasináptico sobre la metabolización estriatal de glutamato. Partiendo del estudio previo, interesaba analizar los posibles mecanismos implicados en la acumulación de glutamato en los astrocitos. Una de las posibilidades era que el glutamato se acumulara por la inhibición de su metabolización astrocítica a glutamina, circunstancia fácil de estudiar mediante microdiálisis. La microdiálisis se realizó de acuerdo a los procedimientos previamente comentados (García Dopico et al. 2004, Rodríguez Díaz et al. 2005). Los animales fueron anestesiados con equitensin y se les introdujo una cánula de microdiálisis concéntrica en el estriado a una velocidad de 500 μm por minuto para minimizar la lesión inespecífica. Las ratas fueron perfundidas con una solución ringer al comienzo de cada experimento durante los primeros 120 minutos, y transcurrido este tiempo, se

añadió a la solución ringer durante 60 minutos glutamato, o un inhibidor de la recaptación de glutamato (L-trans-pirrolidina-2 ,4-dicarboxilato, PDC), o un inhibidor de la glutamina sintetasa (metionina sulfoximina, MSO). Todas las soluciones fueron perfundidos a una velocidad de 2,0 μ l/min y todas las muestras fueron recogidas a intervalos de 20 minutos. El efecto agudo de la administración de glutamato, MSO y PDC en la concentración extracelular del glutamato, la glutamina y la alanina se estudió en 5, 7 y 8, ratas respectivamente. El glutamato, la glutamina y la alanina fueron determinados en los dializados mediante el procedimiento de HPLC/detección fluorimétrica descrito en la sección general de Material y Métodos.

❖ **Resultados**

Los estudios con microdiálisis mostraron que la inhibición del transportador de glutamato con PDC aumenta la concentración extracelular de glutamato y disminuye la síntesis de sus metabolitos astrocíticos glutamina y alanina (lado izquierdo de la figura 11). La administración de glutamato aumentó la alanina (sintetizada en los astrocitos mediante el catabolismo del glutamato por la alanina aminotransferasa), pero disminuyó la glutamina (sintetizada en los astrocitos a través de la catabolización del glutamato por la enzima glutamina sintetasa). Un efecto similar fue encontrado cuando la glutamina sintetasa se inhibió con MSO (lado derecho de la figura 11). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la administración de glutamato aumenta el glutamato intracelular, y que, en un segundo paso, produce una inhibición selectiva y persistente de la glutamina sintetasa (sin modificar la actividad de la alanina aminotransferasa). Dado que en estas circunstancias el glutamato no puede ser metabolizado a glutamina, y ésta no puede ser liberada al medio extracelular por los transportadores de glutamina, parece que la inhibición de la glutamina sintetasa puede ser la causa de la acumulación intracelular persistente de glutamato en astrocitos.

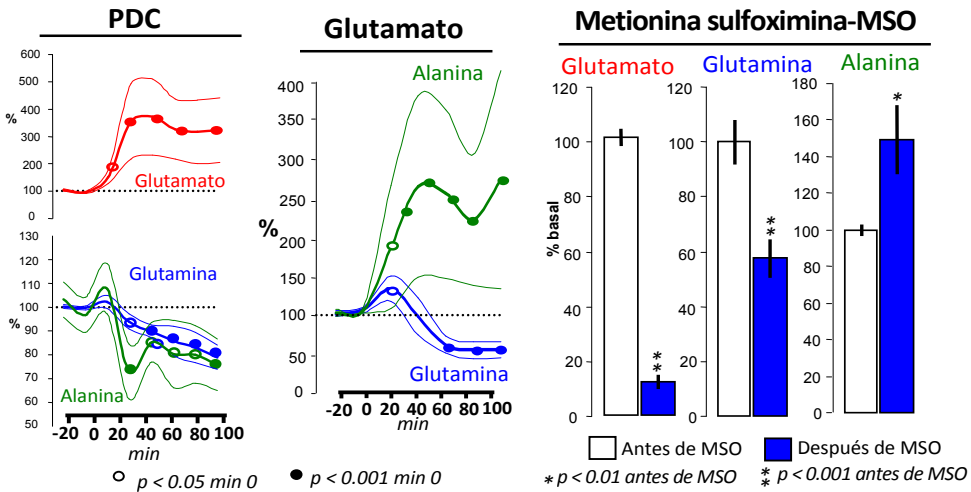


Figura 11. Metabolización del glutamato después de administrar PDC, MSO y glutamato: estudio mediante microdiálisis. Los valores se normalizaron de acuerdo con el valor medio de los tres dializados registrados con anterioridad a la perfusión de las distintas sustancias y representan la media \pm error estándar. La inhibición del transportador de glutamato usando PDC aumentó el glutamato y disminuyó la glutamina y la alanina (lado izquierdo). La perfusión de glutamato aumentó la alanina y disminuyó la glutamina. La inhibición de la glutamina sintetasa con MSO aumento la alanina y disminuyó la glutamina y el glutamato (lado derecho). Estos datos sugieren que la inhibición de la glutamina sintetasa está implicada en la acumulación persistente de glutamato observada en los astrocitos estriatales después de la perfusión extracelular de glutamato.

Discusión Experimentos 1, 2 y 3

La administración transitoria de glutamato en el estriado induce astrogliosis reactiva con acumulación persistente de glutamato en los astrocitos reactivos. La acumulación de glutamato se observó en los astrocitos protoplásmicos y fibrosos, y también en la glía tipo radial que apareció en torno al área de perfusión (un área que presentó pérdida neuronal y astrocítica después de la administración de glutamato). El estudio de microdiálisis mostró la inhibición de la glutamina sintetasa como posible causa de la acumulación de glutamato en los astrocitos.

El tejido estriatal que rodeaba a la cánula de microdiálisis (P región) perdió todos sus astrocitos protoplásmicos y fibrosos, los cuales fueron sustituidos por células GFAP+ que normalmente no se encuentra en el estriado (astrocitos tipo radial). Estas nuevas células formaron una escara (en forma de cápsula alrededor de la lesión) y presentaban procesos radiados similares a los que posee la glía radial de la zona subventricular (García et al. 2004, Hansen et al. 2010, Scheffler et al. 2005, Suzuki y Goldman, 2003). Debido a que la glía radial subventricular es GFAP+ (Doetsch et al. 1999, Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009, Liu et al. 2006) y puede migrar a través del estriado

(Behrstock et al 2006, Zhang et al 2007), podrían ser el origen de los astrocitos tipo-radial observados en la región perilesión. Además, la glía radial subventricular puede diferenciarse completamente a astrocitos (Chojnacki y Weiss 2008, Lois y Alvarez-Buylla 1993, Reynolds y Weiss, 1992), lo que podría explicar la repoblación tardía (6 semanas después de la administración de glutamato) de la región P con nuevos astrocitos protoplásmicos.

Se ha propuesto la existencia de un alto nivel de glutamato extracelular como una de las causas de la astrogliosis reactiva (Sofroniew y Vinters 2010), posibilidad aquí apoyada tanto para los astrocitos protoplásmicos como para los fibrosos. La intensidad de la gliosis reactiva disminuyó progresivamente en las zonas de la región D más alejadas de la zona de perfusión de glutamato, lo que sugiere que hay una relación directa entre la concentración extracelular de glutamato y la intensidad de la astrogliosis. Cerca de la zona de perfusión, la acción del glutamato administrado podría haberse intensificado y prolongado por el glutamato liberado desde las terminales sinápticas y desde las células gliales que degeneraron en la región P como consecuencia de la propia administración exógena de glutamato. Esta circunstancia fue evaluada posteriormente con nuevos estudios en los cuales, en lugar de perfundir glutamato, se perfundieron sustancias capaces de inducir degeneración celular local.

La persistencia de la astrogliosis reactiva no fue la misma para todos los tipos de astrocitos. La respuesta más corta fue encontrada en la glía tipo-radial observada una semana después de la perfusión de glutamato, pero no seis semanas más tarde. Por el contrario, la gliosis de los astrocitos protoplásmicos persistió durante las seis semanas del estudio, ocupando las regiones alrededor de la lesión donde anteriormente se ubicaba la glía tipo-radial (a la semana de la perfusión). Los astrocitos fibrosos también se encontraron activados al final de las seis semanas del estudio.

La consecuencia funcional de la astrogliosis sobre la evolución de las lesiones cerebrales es objeto de debate (de Groot y Sontheimer 2011, Raivich et al. 1999, Sofroniew y Vinters 2010). La observación inicial de que las escaras gliales inhiben la regeneración de los axones sugirió en un principio que la astrogliosis dificulta la adaptación al daño cerebral. Esta posibilidad fue posteriormente re-examinada en estudios que informaron de diferentes efectos beneficiosos de la astroglía reactiva (Sofroniew y Vinters 2010). Una de estas funciones beneficiosas es la capacidad de las células astrogliales de

captar glutamato y evitar su acción excitotóxica (Bush et al. 1999, Rothstein et al. 1996, Swanson et al. 2004). Un nuevo hecho a considerar a partir de los estudios aquí presentados es la capacidad de los astrocitos reactivos para acumular glutamato por largos periodos de tiempo.

La perfusión de glutamato durante 1 hora indujo una marcada acumulación de glutamato en los astrocitos que se prolongó durante más de seis semanas después de la retirada del glutamato perfundido. Por lo que sabemos, esta es la primera vez que se ha informado de la existencia de la acumulación auto-inducida de glutamato en el estriado. Dado que la acumulación auto-inducida de glutamato sólo fue observada en los astrocitos reactivos, es posible que los mecanismos que intervienen en esta acumulación de glutamato y aquellos involucrados en la gliosis reactiva mantengan algún tipo de interacción funcional.

La acumulación auto-inducida de glutamato probablemente requiera de la acción de los transportadores de glutamato glial, y particularmente del EAAT2. El EAAT2 es un transportador de glutamato glial muy abundante en el cerebro (1% de las proteínas del cerebro total) (Danbolt 2001), y en particular en los astrocitos (aunque también se expresa en macrófagos), donde actúa como el principal agente responsable de la eliminación del glutamato del medio extracelular (Foran y Trotti 2009, Robinson 1998). El EAAT2 puede ser necesario para la acumulación inicial de glutamato en los astrocitos (y en macrófagos) inducida por la perfusión de glutamato. Sin embargo, la persistencia de esta acumulación durante semanas es difícil de explicar, tal vez los astrocitos metabolizan el glutamato de forma distinta a como lo hacen en condiciones normales. La perfusión de glutamato disminuyó el nivel de glutamina, lo que sugiere que altas concentraciones de glutamato pueden inducir un bloqueo rápido de la síntesis de glutamina. Esta reducción de la glutamina fue acompañada de un aumento del nivel de alanina, sugiriendo que la inhibición de la catabolización del glutamato es selectiva para la glutamina-sintetasa y no afecta a la actividad de la alanina aminotransferasa. Esta posibilidad también es compatible con la segregación de la respuesta de la glutamina (disminución) y la alanina (aumento) a la inhibición de la glutamina sintetasa con L-metionina sulfoximina (MSO). La inhibición de los transportadores de glutamato con el L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxilato (PDC) aumentó el glutamato, circunstancia que se acompañó de la disminución de glutamina y de alanina. Tomados en conjunto, el incremento del glutamato y la disminución de la glutamina que fue observada después de

la administración de glutamato sugiere que altas concentración de glutamato inhibe la glutamina sintetasa de forma selectiva, sin modificar la actividad de la alanina aminotransferasa o de los transportadores de glutamato. Teniendo en cuenta además, los estudios previos que muestran que la astrogliosis regula a la baja la expresión de la glutamina sintetasa (Ortinski et al. 2010), los datos de este estudio indican que la acumulación auto-inducida de glutamato está asociada a una inhibición selectiva de la actividad de la glutamina sintetasa.

Como sugirieron Xu y colaboradores en su estudio "*in vitro*" en células del hipocampo (Xu et al. 2007) la liberación de glutamato desde la acumulación de glutamato auto-inducido en astrocitos podría originar un aumento masivo de glutamato extracelular seguido de excitotoxicidad. La acumulación del glutamato astrocítico observado en el presente estudio podría producir el mismo efecto en el estriado, lo cual sugiere que la acumulación auto-inducida de glutamato es un fenómeno de mala adaptación. Sin embargo, la producción de una cantidad excesiva de glutamina también puede dañar a las neuronas. Se ha publicado que la glutamina puede inhibir la actividad metabólica de las mitocondrias (Mates et al. 2009), y promover encefalopatía hepática (Albrecht et al. 2007, Hourani et al 1971, Lemberg y Fernández 2009). Así, la inhibición de glutamina sintetasa también podría ser considerado como un fenómeno adaptativo que previene la toxicidad de la glutamina. No obstante, se han descrito numerosos estímulos (inflamación, isquemia, producción de especies reactivas de oxígeno, activación microglía...) y mecanismos (liberación vesicular, función inversa de los transportadores de glutamato, apertura de canales aniónicos, hemicanales...) que podrían activar la liberación masiva de glutamato desde el citosol de los astrocitos al medio extracelular, con lo cual el almacenamiento masivo de glutamato por periodos largos supone una amenaza para las células del entorno. La persistencia de la acumulación auto-inducida de glutamato fue diferente en los astrocitos protoplásmicos que en los fibrosos. La acumulación auto-inducida de glutamato en astrocitos protoplásmicos observada una semana después de la administración de glutamato fue reemplazada seis semanas más tarde por el fenómeno contrario, una disminución de glutamato hasta niveles inferiores a los calculados en el estriado contralateral. Los astrocitos fibrosos mostraron acumulación de glutamato auto-inducido en esta etapa tardía.

En resumen, la perfusión local de glutamato en el medio extracelular del estriado indujo una astrogliosis reactiva diferente para la glía

tipo-radial, que para astrocitos protoplásmicos y fibrosos. Esta gliosis astrocítica se acompañó de una acumulación persistente de glutamato citosólico probablemente asociada a una disminución de la actividad glutamina sintetasa. El exceso de activación glutamatérgica ha sido relacionado con la progresión de enfermedades degenerativas como la enfermedad de Huntington y el Parkinson. El presente estudio muestra que un exceso transitorio en la activación de la transmisión glutamatérgica puede desencadenar una astrogliosis reactiva que acumula grandes cantidades de glutamato intracitosólico que podrían mediar en la progresión de estos trastornos de los ganglios basales.

Experimento 4: Excitotoxicidad glutamatérgica estriatal y degeneración retrógrada.

La degeneración lenta de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales en la enfermedad de Parkinson se considera generalmente como el resultado de la acción sinérgica de varios factores, uno de los cuales es la acción excitotóxica del glutamato neuronal (Olanow et al. 1999, Obeso et al. 2011 o glial (Morales et al. 2009, Rodriguez Diaz et al. 2005). El glutamato modula las células dopaminérgicas nigroestriatales actuando tanto sobre la sustancia negra (SN) como en el estriado (Parent et al. 1995, Scarnati et al. 1986, Tokunaga et al. 2009), por lo que ambos centros podrían estar involucrados en la excitotoxicidad glutamatérgica. El glutamato nigral daña directamente el soma de las células dopaminérgicas (que en la enfermedad de parkinson puede ser inducido por la alta tasa de disparo observada repetidamente en las neuronas glutamatérgicas subtálamo-nigrales) (Rodriguez-Oroz et al. 2001) mientras que el glutamato estriatal para inducir efectos retrógrados necesitaría degenerar las células nigroestriatales (excitotoxicidad retrógrada). No se han encontrado estudios previos sobre la posible acción de la excitotoxicidad retrógrada en la enfermedad de Parkinson, ya que la mayor parte de los estudios se centran en la excitotoxicidad del glutamato en la sustancia negra. Sin embargo, existe una creciente evidencia que sugiere que la degeneración de las células dopaminérgicas comienza en sus terminales sinápticas estriatales y progresa hacia el soma de la célula en la sustancia negra (Cheng et al. 2010). El mecanismo de esta degeneración retrógrada sigue siendo desconocido. Teniendo en cuenta la marcada interacción estriatal entre las sinapsis glutamatérgicas y dopaminérgicas (Carlsson y Carlsson 1990, Whitton et al. 1997, Borland et al. 2004), un posible candidato para el

desencadenamiento de esta degeneración podría ser el exceso de glutamato. Esta excitotoxicidad retrógrada podría explicar no sólo la pérdida de células dopaminérgicas nigroestriatales, sino también la pérdida de otras células que, como ocurre con los núcleos intralaminares del tálamo, proyectan al estriado y degeneran en la enfermedad de Parkinson (Henderson et al. 2000, Smith et al. 2009).

❖ **Metodología.**

El objetivo de este experimento fue estudiar la toxicidad del glutamato en las aferencias al estriado mediante la evaluación del daño inducido por la administración extracelular de glutamato, y de los agonistas ionotrópicos de los receptores glutamatérgicos sobre las terminales sinápticas dopaminérgicas y glutamatérgicas. La producción de excitotoxicidad retrógrada fue analizada mediante el estudio de la posible degeneración a distancia de las células dopaminérgicas nigro-estriatales (cuantificada en la sustancia negra) y de las células glutamatérgicas tálamo-estriatales (cuantificada en los núcleos intralaminares del tálamo) (Smith 2009, 2004). Todos los fármacos se administraron por microdiálisis reversa.

Para estos experimentos se utilizaron 7 grupos de 6 ratas macho Sprague-Dawley de peso comprendido entre 300 y 350 g, dos grupos para el estudio de las concentraciones de glutamato perfundidas (1mM y 10 mM), tres grupos para cada uno de los agonistas glutamatérgicos (AMPA, NMDA y kainato), uno para el estudio de los efectos de la administración de dopamina y otro para el estudio de los efectos de la aplicación de haloperidol.

El efecto de la dopamina y del haloperidol sobre el nivel de glutamato extracelular extrasináptico del estriado se estudió por microdiálisis según los procedimientos ya descritos. Los animales fueron anestesiados con equitensín y la cánula de microdiálisis fue introducida en el estriado, a través de la cual, se perfundieron soluciones ringer a una velocidad de 2,0 μ l/min. Se desecharon las muestras de los primeros 150 minutos tras la inserción de la cánula en el estriado y las fracciones de dializado se recogieron a intervalos de 15 min. La dopamina o el haloperidol fueron perfundidos a través de la cánula de microdiálisis durante 45 min. La solución de ringer utilizada durante el período anterior a la administración del fármaco en el experimento de la perfusión de dopamina contenía ácido ascórbico (0,4 mM) con el fin de evitar la oxidación de la dopamina. El haloperidol se disolvió inicialmente en

ácido acético y luego se diluyó en ringer (1 mM haloperidol en 19,1 mM de ácido acético / LCR; pH = 6,0). El glutamato se cuantificó antes (durante 30 minutos) y durante la infusión del fármaco mediante HPLC con detector fluorimétrico.

El efecto tóxico del glutamato se estudió mediante la perfusión de glutamato o de los agonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato a través de la cánula de microdiálisis. Las ratas fueron perfundidas con una solución ringer durante los primeros 90 minutos y luego con una solución ringer con 1 mM o 10 mM de glutamato durante 60 minutos. Un procedimiento similar se utilizó para la perfundir las ratas con soluciones 0,5 mM de los agonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato: AMPA (RS- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionic hidrobromuro ácido), KA (ácido kaínico), y de NMDA (N-metil-o-ácido aspártico).

De cuatro a seis semanas después de la perfusión del fármaco, las ratas fueron sacrificadas y fijadas según el protocolo ya mencionado con anterioridad. Los cerebros fueron extraídos y almacenados a -80°C hasta ser cortados en rodajas de 30 μ m de grosor. Con el fin de observar el efecto de los fármacos inyectados a través de la cánula de microdiálisis, los cerebros fueron cortaron en planos axiales paralelos a la superficie de la corteza cerebral y perpendicular a la trayectoria de la cánula (véase figura 12) Las secciones fueron recogidos en 7 series paralelas y procesadas para inmunohistoquímica. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: el anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa (anti-TH), el anticuerpo monoclonal anti-macrosialin de ratón (anti-CD68), y el anticuerpo monoclonal anti-proteína específica neuronal nuclear hecho en ratón (anti-NeuN) en una solución de PBS. Las incubaciones con estos anticuerpos se siguieron de incubaciones con anticuerpos de cabra anti-ratón biotinilado en PBS, incubaciones precedidas por otra con ExtrAvidin-peroxidasa. Posteriormente, se realizó una solución de revelado con 3'-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) y H₂O₂ para hacer las visibles reacciones. Los cortes fueron deshidratados en alcoholes de graduación creciente, blanqueados en xileno, y cubiertos con Eukitt. La colocación de la cánula de microdiálisis se confirmó con violeta de cresilo.

Los doble marcajes de inmunofluorescencia se realizaron incubando las secciones en PBS con los anticuerpos primarios anti-TH de conejo y anti-VGlu2 de ratón o anti-TH de ratón y anti-NeuN de conejo, o anti-VGlu2 de ratón y anti-NeuN de conejo. Posteriormente, las secciones fueron sumergidas

en una solución de PBS que contenía anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Rodamina Red X, anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón biotinilado, seguido de una solución de PBS con estreptavidina conjugada con Cy2. Después de varios lavados, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, secado al aire, cubiertas con Vectashield (Vector), y examinada bajo un microscopio confocal utilizando los filtros adecuados. A algunas de las secciones se les realizó un triple marcaje de inmunofluorescencia al realizarles una última incubaron con DAPI justo antes de ser montados, secado y cubierto. Se realizaron controles para cada estudio inmunohistoquímico y de inmunofluorescencia mediante la eliminación del anticuerpo primario, lo que resultó en tinción negativa.

Se realizó la cuantificación densitométrica de la innervación dopaminérgica alrededor de la cánula de microdiálisis, según lo descrito en Material y Métodos. Los valores obtenidos en el estriado inyectado se normalizaron como un porcentaje de los valores calculados para la misma región estriatal del lado contralateral.

La degeneración celular en el estriado se evaluó mediante inmunohistoquímica NeuN. La degeneración relativa de las terminales glutamatérgicas tálamo-estriatales y dopaminérgicas nigro-estriatales alrededor de la cánula de microdiálisis se estudiaron usando cortes con doble (NeuN y vGLUt2; NeuN y TH) y triple (DAPI, TH y vGLUt2) marcaje que fueron evaluadas mediante microscopía confocal.

La degeneración retrógrada de las células dopaminérgicas fue estudiada mediante el conteo del número de células TH+ (DAB) en el mesencéfalo con la ayuda del programa Image-Pro Plus, según lo redactado en la sección de Material y Métodos. El número de células contabilizadas fueron referidas a las células contadas para la misma región en el mesencéfalo contralateral, de tal forma que, si no hay degeneración celular, el porcentaje de células TH contado en el mesencéfalo ipsilateral del estriado inyectado sería alrededor del 100% (sólo se incluyeron cortes simétricos en el estudio).

Se contabilizó el número de neuronas (células NeuN +, DAB) en los núcleos del tálamo que proyectan al estriado para estudiar la posible degeneración retrógrada en las células talámicas, según procedimiento descrito en la sección de Material y Métodos. El número de células contadas en los núcleos del tálamo del lado del cerebro ipsilateral a la inyección del fármaco se normalizó como un porcentaje del total de células contadas en los

núcleos de ambos lados del cerebro, de modo que, si no hay degeneración celular, el porcentaje de células contadas en los núcleos intralaminares del lado ipsilateral al estriado inyectado sería de alrededor del 50%).

❖ **Resultados**

La tasa de transferencia de aminoácidos y de fármacos a través de la membrana de las cánulas de microdiálisis se comprobó in vitro antes de cada experimento, mostrando valores de entre un 10-15% para el glutamato y para los agonistas glutamatérgicos. La concentración basal de los niveles extracelulares de glutamato se situó entre 0.65 and 1.9 μM ($1.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$) (figura 13A). La perfusión de dopamina indujo una marcada disminución de los niveles de glutamato extracelular del orden de un 20% menos del calculado antes de la administración de dopamina (figura 12B). El bloqueo de los receptores de dopamina con haloperidol aumentó el glutamato extracelular en un 300-400% respecto a niveles basales (figura 13C).

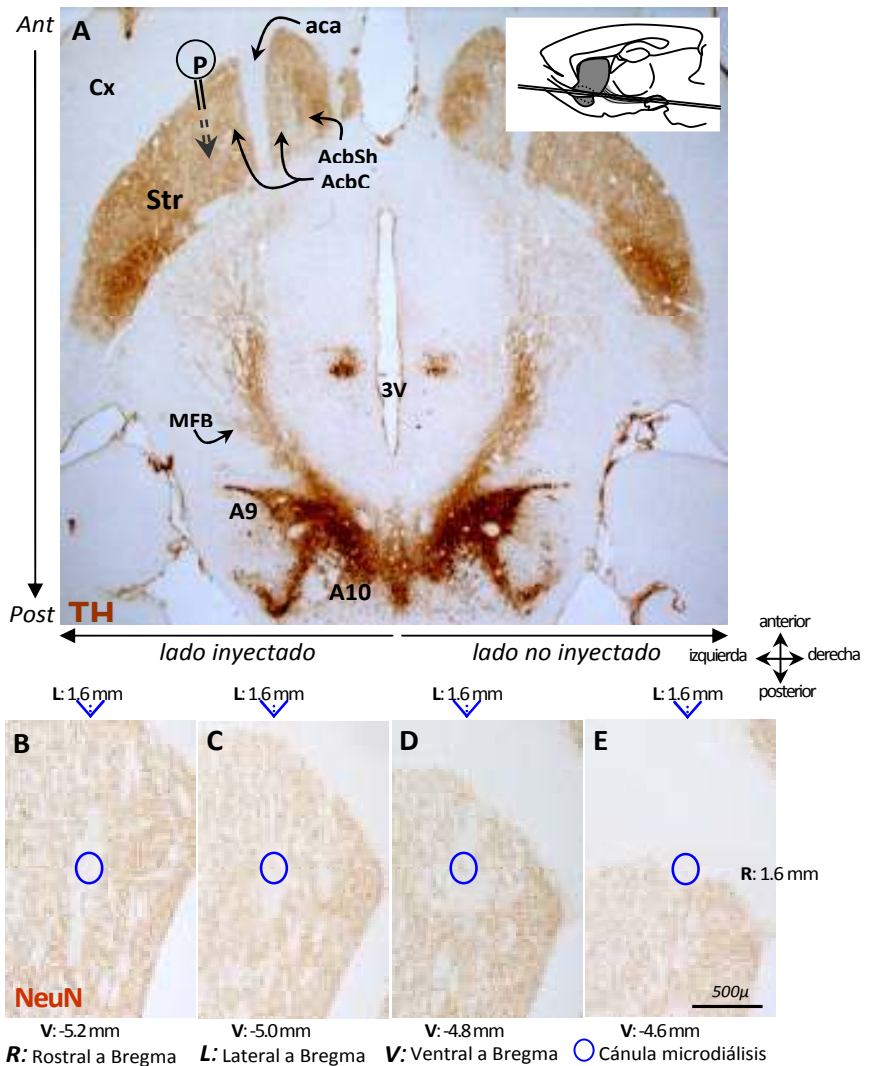
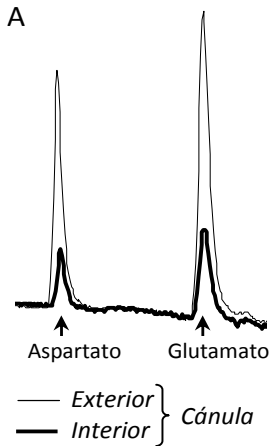


Figura 12. A. Vista axial del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Las células tirosina hidroxilasa (TH), proyectan desde el mesencéfalo (células A9 y A10) a través del haz medial del cerebro anterior (MFB) al estriado y a la cubierta (AcbSh) y centro (AcbC) del núcleo accumbens B-E. Posición dorso-ventral de la cánula de microdiálisis (círculo azul). aca: comisura anterior, Cx: corteza, P: trazado ortogonal de una cánula de microdiálisis.

Cánula de microdiálisis
(Tasa de transferencia)



Glutamato cerebral
(% nivel basal)

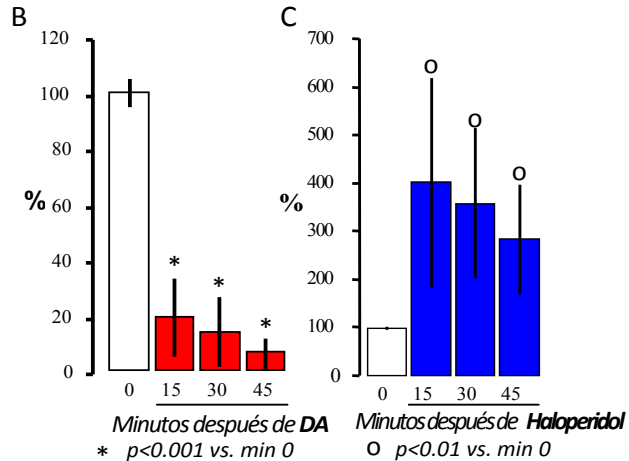
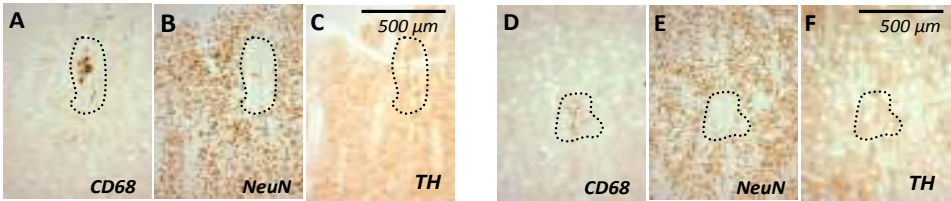


Figura 13. A. Picos cromatográficos típicos de aspartato y glutamato (Glu) de las muestras obtenidas fuera (solución 100 μ M) vs interior (ringer) de la membrana de la cánula de microdiálisis durante los ensayos "in vitro" de la tasa de transferencia de una cánula. B. Cambios del GLU extracelular durante la perfusión de dopamina (DA). C. Cambios del glutamato extracelular durante la perfusión de haloperidol (HAL). Los valores se muestran como un porcentaje del valor medio calculado de 0 a 45 minutos antes de la administración del fármaco (media \pm error estándar).

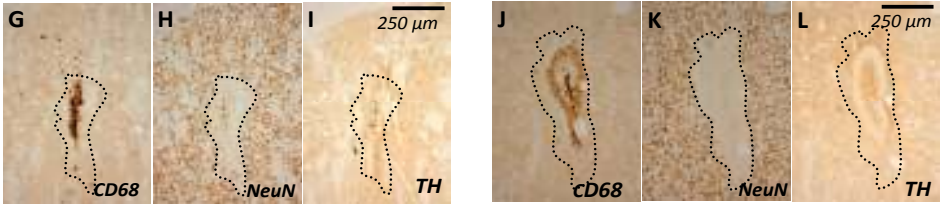
No se observó denervación dopaminérgica en el estriado después de la administración de glutamato, NMDA, AMPA o kainato. La figura 14 muestra ejemplos de denervación estriatal no dopaminérgica en áreas con pérdida de células después de la administración de los fármacos. La administración de glutamato (figuras 14A-14D), de NMDA (figuras 14E y 14F), de AMPA (figuras 14G y 14H) y de kainato (figuras 14I y 14J) indujeron pérdida de células en las regiones estriatales mientras mantenían una innervación dopaminérgica similar a la observada en las mismas regiones del estriado contralateral (compárese las figuras de la izquierda para la tinción inmunohistoquímica de NeuN y las figuras de la derecha para la inmunohistoquímica de TH). De manera similar, las terminales sinápticas TH + no disminuyeron en las regiones estriatales alrededor de la cánula de microdiálisis (figuras 14T-14X). La figura 15A muestra los botones sinápticos (rojo) en una región normal del estriado donde se distribuyen entre las zonas de fibras (cian) y las neuronas (verde). Las figuras 15B y 15C muestran dos ejemplos representativos de la innervación dopaminérgica normal (rojo) de la región del estriado que rodea de la cánula de microdiálisis y que mostró pérdida de neuronas (las neuronas se muestran en color verde). Las figuras 15D-15G

son un ejemplo de la pérdida sináptica observada en las neuronas tálamo-estriado (VGluT2 en verde) de la región del estriado alrededor de la cánula de microdiálisis que mostró pérdida de neuronas (las células gliales en azul y las neuronas en azul / rojo). Un ejemplo de la denervación alrededor de la cánula se muestra en las figuras 14D-14E (compárese con la inervación normal mostrada en 15F-15G en la misma región del estriado contralateral). Las figuras 16I y 16J muestran una pérdida selectiva de terminales glutamatérgicas (16J) en la región del estriado alrededor de la cánula de microdiálisis donde no se observó pérdida alguna de terminales dopaminérgicas (15J). Otro ejemplo de la degeneración selectiva de las aferencias glutamatérgicas tálamo-estriatales se puede observar en la figura 14K donde la región cercana a la cánula de microdiálisis muestra una inervación dopaminérgica normal y una denervación glutamatérgica (Fig. 15M), mientras que las regiones alejadas de la cánula muestran una inervación dopaminérgica y glutamatérgica normal (figura 15L).

GLU 1 mM



GLU 10 mM



NMDA 0.5 mM

AMPA 0.5 mM

Kainato 0.5

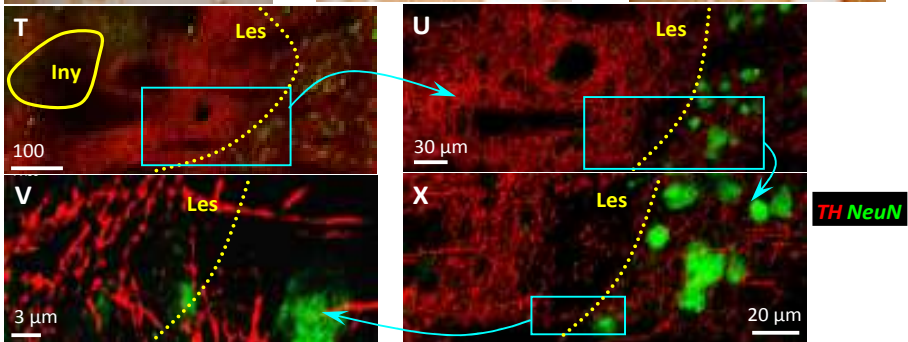
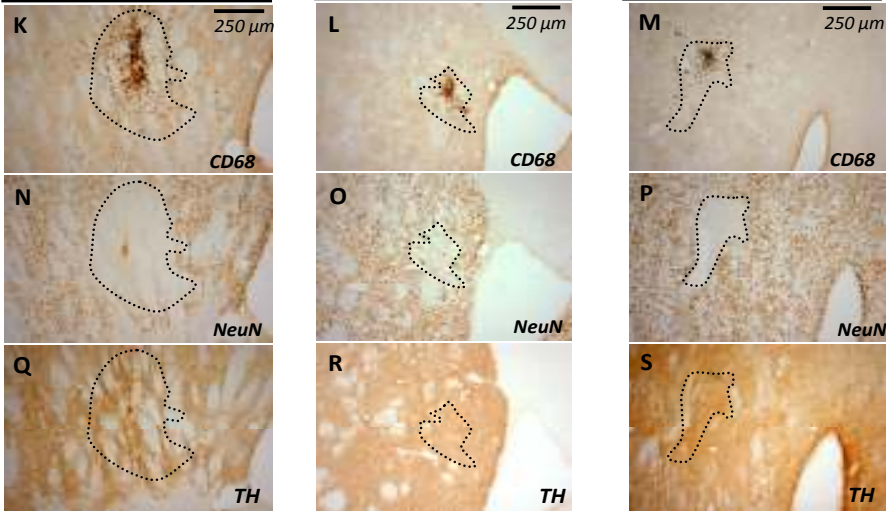


Figura 14. Ejemplos que muestran la distribución típica de la microglía activada (CD68), las neuronas (NeuN) y la invasión dopaminérgica (TH) en el tejido estriatal que rodeaba a la cánula de microdiálisis (cortes perpendiculares a la trayectoria de la cánula). Las áreas que muestran pérdida de neuronas después de la perfusión de glutamato (Glu) 1 mM (A a F), de Glu 10 mM (G a L), de n-metil-D-aspartato (NMDA) 0,5 mM (K, N y Q), ácido RS- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) 0,5 mM (L, S y R) y kainato 0,5 mM (M, P y S) están rodeados con una línea de puntos. Ejemplo de la persistencia de la invasión dopaminérgica en regiones del estriado que mostraron degeneración celular después de la perfusión de GLU (imágenes de la parte inferior, T a X). Las sinapsis y los axones dopaminérgicos se muestran en rojo (TH +) y las neuronas del estriado se muestran en verde (NeuN+). Iny: área de la inyección, Les: región con degeneración de las células del estriado.

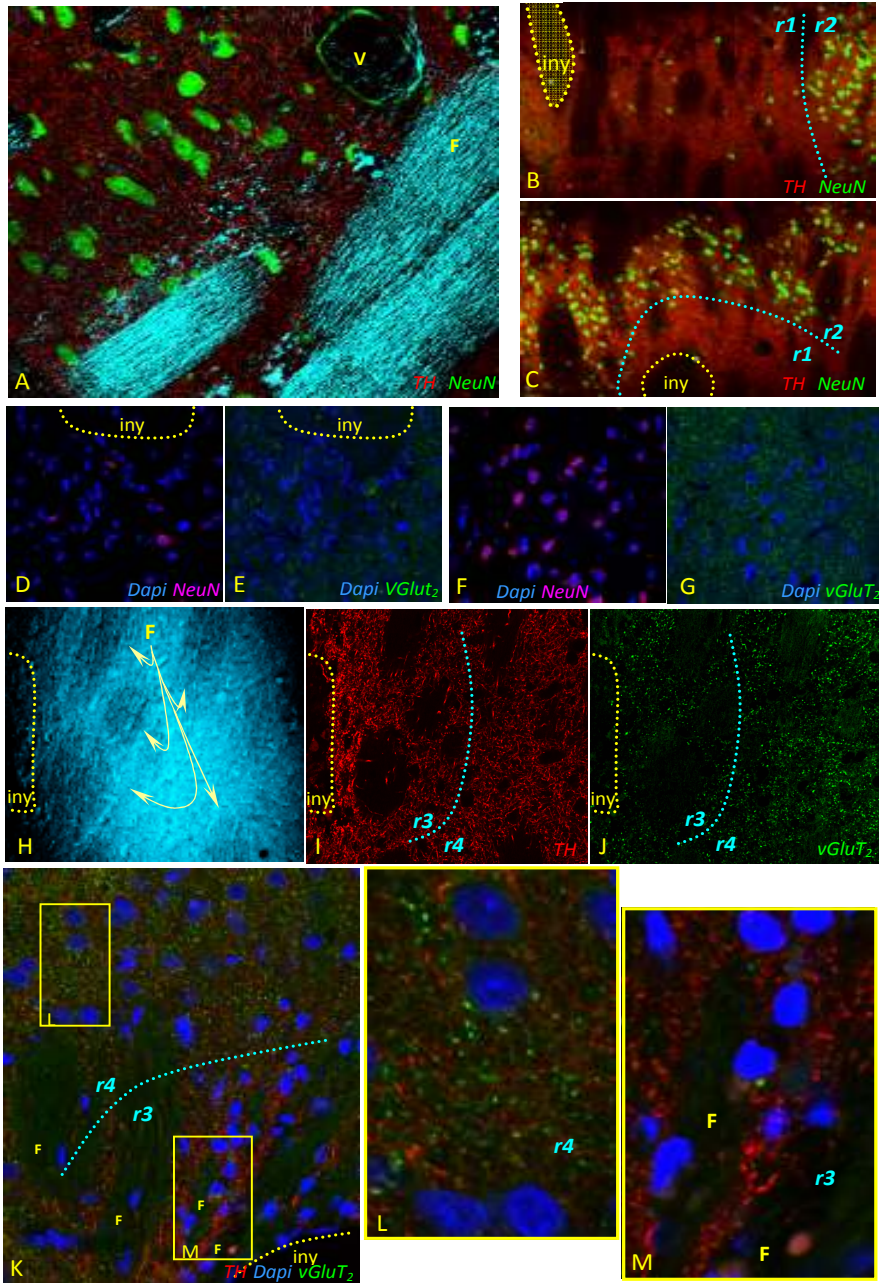
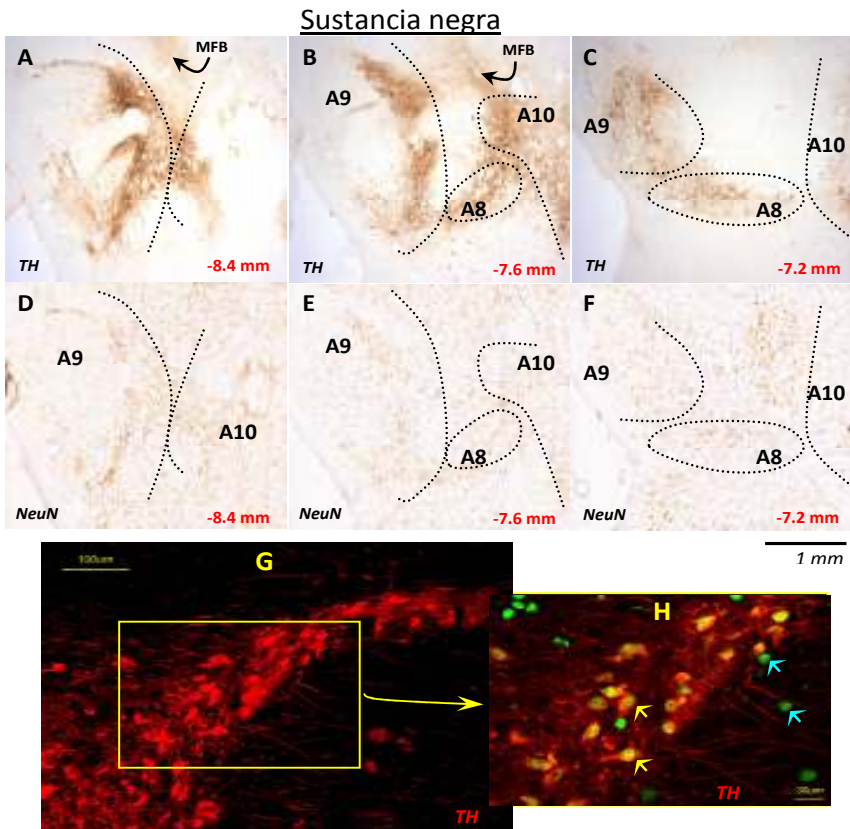


Figura 15. La denervación tálamo-estriatal y nigro-estriatal después de la perfusión de glutamato en el estriado. **A:** sinapsis dopaminérgicas (botones TH + en rojo) del estriado no lesionado distribuidas alrededor de los tractos estriatales (marcadas en pseudocolor cian -F-), vasos (V) y neuronas (las neuronas NeuN + en verde). **B y C:** invasión dopaminérgica (botones TH + en rojo) en las regiones del estriado circundantes a la cánula de microdiálisis (INY) que presentó (r1) o no (r2) pérdida neuronal (NeuN + neuronas en verde). **D-G:** invasión tálamo-estriatal (botones VGLUT2 en verde) alrededor de la cánula de microdiálisis (**D y E**) donde se observó pérdida de la misma e invasión tálamo-estriatal en la región homóloga del estriado contralateral (**F y G**) (núcleos de células DAPI + en color azul y neuronas DAPI + / NeuN + en azul / rosa). **H-J:** región del estriado (r3) alrededor de la cánula de microdiálisis (iny) que mostró una invasión dopaminérgica normal (botones rojos TH + en I) con pérdida de invasión glutamatérgica (botones verdes VGLUT2 + en J). Región (r4) alejada de la cánula de microdiálisis con invasión dopaminérgica y glutamatérgica normal. **K-M:** otro ejemplo de denervación tálamo-estriatal (r3) alrededor de la cánula de microdiálisis (INY). **L:** región del estriado (r4) mostrando una invasión dopaminérgica (botones TH + en rojo) y glutamatérgica (botones VGLUT2 + en verde) normales. **M:** región (r3) con una invasión dopaminérgica normal (botones TH + en rojo) acompañado de denervación glutamatérgica (botones VGLUT2 + en verde) (F apunta a las zonas de fibras).

No se observó pérdida de células dopaminérgicas mesencefálicas tras la administración de los distintos productos perfundidos en el estriado (figuras 16A-16C muestran células TH + y figuras 16D-16F muestran células NeuN +). La parte inferior de la figura 16 muestra el número de neuronas TH inmunorreactivas en la sustancia negra (células A9), en el área tegmental ventral (células A10) y en el núcleo retrorrubral (células A8) como porcentaje del número de células TH contadas en la misma región mesencefálica del lado contralateral del cerebro. No se observó ningún efecto significativo en este caso para ninguno de los fármacos en ninguna de las regiones mesencefálicas estudiadas.



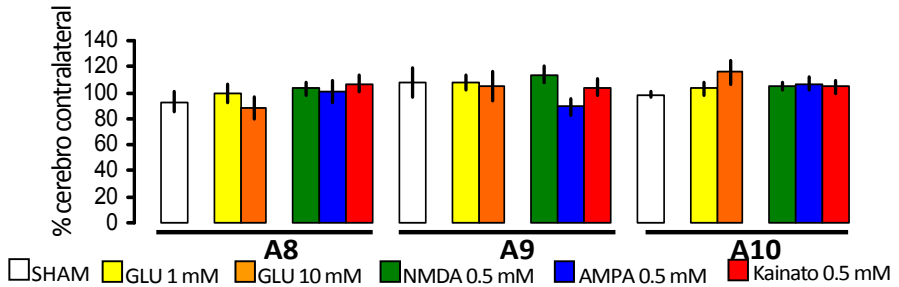


Figura 16. La distribución de las células mesencefálicas a diferentes distancias desde la superficie de la corteza cerebral se muestra en **A, B y C** (células TH+) y en **D, E y F** (NeuN+ células). Un detalle de la porción anterior de la sustancia negra se muestran en **G y H** (células TH+ en rojo y núcleos de neuronas NeuN+ en verde). El número de las células dopaminérgicas se calculó contando las neuronas (NeuN+) que mostraron inmunoreactividad TH (se señalan dos ejemplos mediante flechas amarillas). Las flechas de color turquesa indican dos ejemplos de neuronas nigrales no computado en el estudio. Se cuantificó el número de neuronas en un volumen de 100 micras x 100 micras x 30 micras dentro de las regiones mesencefálicas pertenecientes a las poblaciones A8, A9 y A10 (parte inferior). Los valores se muestran como un porcentaje del número medio de células contadas para las mismas regiones del cerebro contralateral (media \pm error estándar). ANOVA: $F = 0,98 / p = 0,42$ para el A8 células, $F = 1,03 / p = 0,39$ para células A9, y $F = 1,38 / p = 0,23$ para las células A10.

El número de neuronas (células NeuN) en los núcleos intralaminares del tálamo no disminuyó en las ratas control (figura 17). La administración de glutamato no indujo ningún efecto sobre el número de neuronas cuantificadas en los núcleos intralaminares dorsal (figura 17A), lateral (figura 17B) y medial (figura 17C) del tálamo. Los agonistas ionotrópicos glutamatérgicos perfundidos en el estriado disminuyeron el número de neuronas talámicas (valores calculados en porcentaje del total de células contadas en ambos lados del cerebro; si no se produce degeneración celular el 50% del total de las células corresponderá al cuantificado para el lado del cerebro inyectado). La disminución celular en los núcleos intralaminares del tálamo observada en todos los agonistas glutamatérgicos, fue más evidente para el AMPA en el tálamo medial (figura 17C). Así, mientras que los agonistas glutamatérgicos inducen efectos en el estriado y el tálamo, el glutamato induce un claro efecto en el cuerpo estriado, pero no en el tálamo.

Núcleos talámicos intralaminares

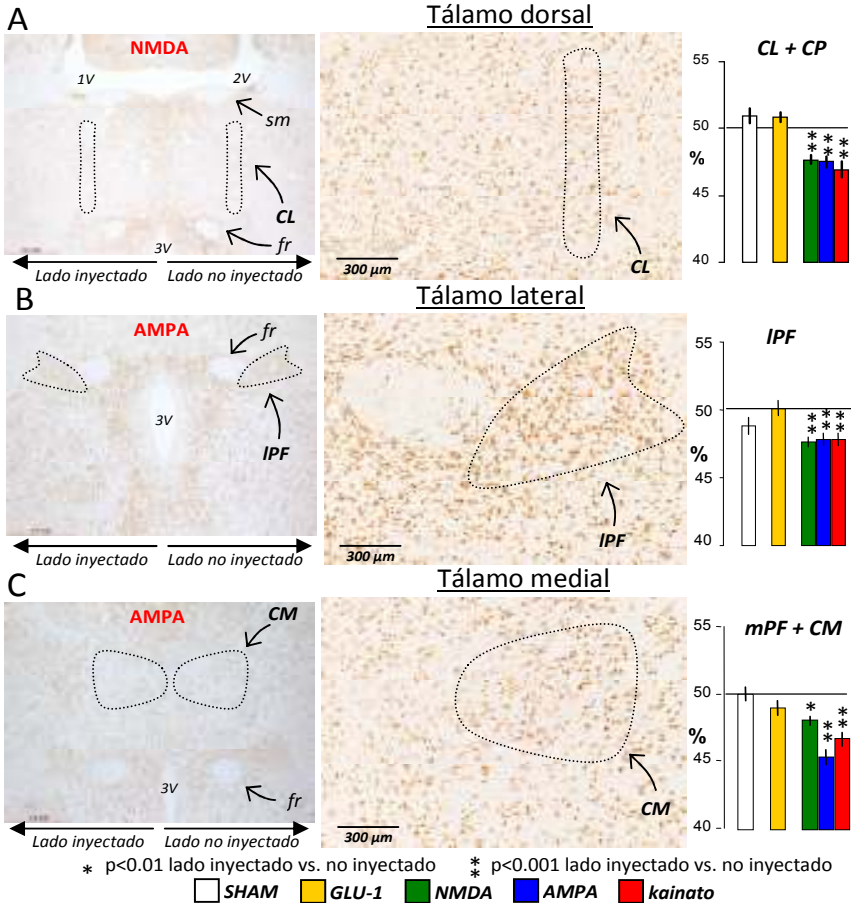


Figura 17. Neuronas NeuN+ de los núcleos intralaminares del tálamo después de la perfusión de ringer (control), glutamato 1 mM, NMDA 0,5 mM, AMPA 0,5 mM y kainato 0,5 mM (KA). Ejemplo de la imagen (arriba) y del conteo de células (inferior) para cada centro. ANOVA para los núcleos intralaminares del: tálamo ventral (ANOVA $F = 11,35 / p < 0,001$), tálamo dorsal ($F = 18,60 / p < 0,001$), tálamo medial ($F = 12,18 / p < 0,001$), tálamo lateral ($F = 5,23 / p < 0,001$), y tálamo dorsal ($F = 11,35 / p < 0,001$). 1V: 1^o ventrículo; 2V: 2^o ventrículo; 3V: 3^o ventrículo; SM: estria medularis; fr: fascículo retroflexus; LPF: parafascicular núcleo pars lateral; CM: núcleo central medial, núcleo centrolateral (CL), núcleo de paracentral (PC); parafascicular núcleo pars medialis (MPF). Los valores se muestran como un porcentaje del número medio de células computado para las mismas regiones del cerebro contralateral (media \pm error estándar).

Las regiones talámicas que mostraban pérdida neuronal después de la administración estriatal de agonistas glutamatérgicos mostraron siempre una activación microglial local. En la figura 18 se muestra la activación microglial (expresión CD68) en uno de los núcleos intralaminares (núcleo centrolateral) que mostró pérdida neuronal (véase las células NeuN en la parte inferior de la figura 18) después de la perfusión estriatal de kainato. Este doble efecto (pérdida neuronal + activación de la microglía) se observó sólo en el lado del cerebro ipsilateral a la perfusión del estriado. No se observó una activación microglial similar en la sustancia negra.

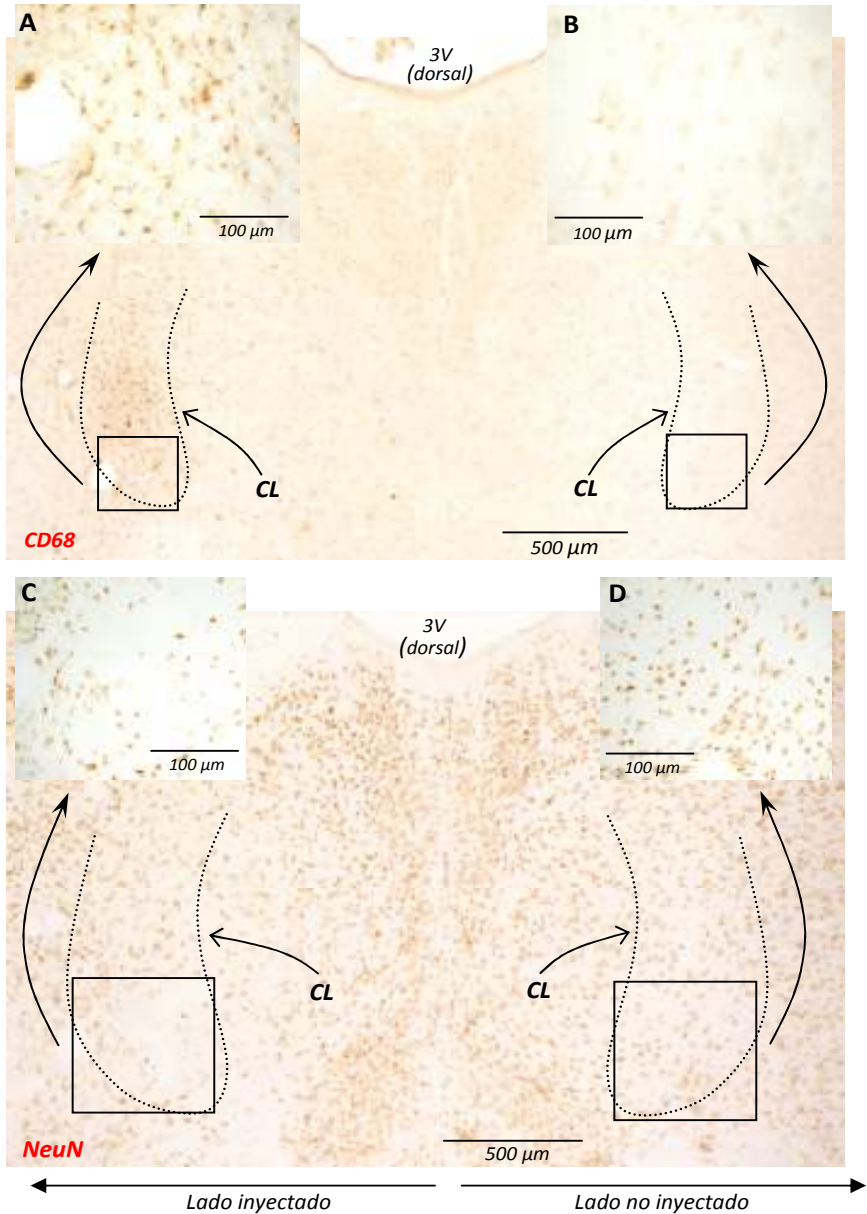


Figura 18. Células de la microglía activada (CD68+) y neuronas (NeuN+) en los núcleos intralaminares tras las lesiones del estriado. Ejemplo de la activación microglial (arriba) y de la degeneración neuronal a distancia (abajo) en el núcleo centralateral (CL) del tálamo dorsal. El número de neuronas es menor en el CL ipsilateral al estriado inyectado con kainato 0.5mM (C) que en el CL contralateral (D). La microglía activada se observó en el CL ipsilateral al estriado de la inyección de kainato (A), pero no en el CL contralateral. 3V: ventrículo tercero.

❖ **Discusión.**

La estimulación de los receptores glutamatérgicos estriatales produjo una degeneración retrógrada de las neuronas que proyectan al estriado, un efecto que fue más marcado para los agonistas de los receptores ionotrópicos que para el glutamato, y para las neuronas tálamo-estriatales que para las neuronas nigro-estriatal. Estos datos apoyan la excitotoxicidad como un mecanismo capaz de inducir degeneración retrógrada (excitotoxicidad retrógrada). El aumento del glutamato extracelular observado después de la inhibición de la transmisión dopaminérgica sugiere la participación de la excitotoxicidad retrógrada en la degeneración de las células no dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson.

La estimulación glutamatérgica del estriado degeneró las terminales glutamatérgicas tálamo-estriatales y sus somas neuronales en los núcleos intralaminares del tálamo, un efecto que fue acompañado por microgliosis estriatal y talámica. Diferentes mecanismos pueden estar detrás de esta toxicidad a distancia. La baja dosis de glutamato aplicado en el estriado (que produce una pequeña lesión que sólo alcanza unos pocos cientos de micras alrededor de la cánula de microdiálisis) sugiere que la causa de la degeneración talámica no es la difusión del fármaco (la degeneración celular se produjo a milímetros de distancia de la zona estriatal donde se practicó la perfusión del glutamato y de los agonistas glutamatérgicos). En algunos centros se ha evidenciado la degeneración celular después de su denervación (degeneración anterógrada). Aunque la administración de glutamato degeneró algunas neuronas del estriado, la pérdida de células talámicas no puede ser atribuida a una degeneración anterógrada, ya que los núcleos intralaminares no reciben aferencias directas desde el estriado (Smith et al. 2009, Smith et al. 2004). Sin embargo, la degeneración axonal retrógrada sí podría explicar la degeneración a distancia de las neuronas de los núcleos intralaminares del tálamo. Las proyecciones de los núcleos intralaminares talámicos constituyen una de las mayores aferencias al estriado (Smith et al. 2004, Berendse et al. 1990, Van der Werf et al. 2002, Vercelli et al. 2003, Sadikot et al. 1992, Smith et al. 1990, Smith et al. 2001). Las terminales sinápticas de estas proyecciones (identificada en el estudio por la presencia de VGluT2) (Smith et al. 2009, Fremeau et al. 2001, Herzog et al. 2001) degeneraron después de la estimulación de los receptores de glutamato estriatales. La pérdida de sinapsis glutamatérgicas podría continuarse con una degeneración retrógrada

de los axones de las neuronas tálamo-estriatales, proceso similar al propuesto para las células nigro-estriatales tras sufrir daños en sus terminales sinápticas (Cheng et al. 2010). El efecto del kainato podría estar mediado por una estimulación excesiva de los recetores presinápticos de ácido kaínico (Smith 2004, Bernard 1998). Sin embargo, esta posibilidad no se puede argumentar para el AMPA y el NMDA debido a que las terminales presinápticas de las neuronas tálamo-estriatales no presentan estos receptores ionotrópicos (Smith 2004). Sin embargo, los receptores AMPA y NMDA se han observado en axones y en oligodendrocitos, y su estimulación intensa podría inducir la degeneración de estas células gliales (Matute 2006, Oka et al. 1993) y las neuronas vinculadas a ellos (Matute 2006, Bakiri et al. 2009, Karadottir et al. 2007, Matute et al. 2006).

Las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales mostraron una baja vulnerabilidad a la acción excitotóxica de glutamato (en relación a la observada para las aferencias tálamo-estriatales) cuando éste actúa sobre los axones o en los terminales sinápticos dopaminérgico estriatales. Ni la innervación dopaminérgica del estriado, ni el soma de las células dopaminérgicas en la sustancia negra degeneraron, en las regiones que mostraron pérdida neuronal, tras la administración de glutamato o de los agonistas glutamatérgicos en el estriado. Las células dopaminérgicas nigroestriatales presentan receptores ionotrópicos glutamatérgicos en su soma nigral (Chatha et al. 2000), pero no en sus terminales estriatales (Bernard et al. 1997, Bernard et al. 1998, Chen et al. 1998, Gracy et al. 1999). Este hecho junto a la falta de mielinización de sus axones (Rodríguez et al. 1990) (lo que podría prevenir la toxicidad indirecta de glutamato inducida por la acción sobre los oligodendrocitos), podría explicar la baja vulnerabilidad al glutamato de estas células nigrales. Sin embargo, estos resultados negativos no descartan totalmente la posible acción excitotóxica del glutamato sobre las células dopaminérgicas, que podría actuar sobre la propia sustancia negra (en los somas) y por medio de otros mecanismos (degeneración astrocítica...).

A pesar del hecho de que las dosis utilizadas aquí fueron veinte veces mayores para el glutamato que para los agonistas glutamatérgicos (1-10 mM para el glutamato vs 0,5 mM para los agonistas, y con una tasa de transferencia a través de la membrana de microdiálisis similar en ambos casos), la degeneración de las células alrededor de la cánula de microdiálisis fue más marcada para los agonistas glutamatérgicos que para el glutamato. Esta diferencia podría explicarse por la acción de los transportadores de

glutamato, muy eficaces en la disminución del glutamato, pero no en la de los agonistas glutamatérgicos [49-53], lo que probablemente hizo que la concentración, la vida media y la difusión fueran mucho menor para el glutamato que para los agonistas glutamatérgicos. Teniendo en cuenta la tasa de la transferencia de la cánula de microdialisis (10-15%) y la dilución del fármaco inducida por la difusión, la concentración del agonista glutamatérgico en el medio extracelular probablemente nunca fue mayor de 30 μM , una concentración más adecuada para la activación de los receptores glutamatérgicos extrasinápticos que para los receptores glutamatérgicos sinápticos (normalmente bajo la acción de 1-5 mM de glutamato). Así, la acción excitotóxica de los agonistas glutamatérgicos es probablemente la consecuencia de la sobre-activación del reservorio neuromodulador de glutamato más que del reservorio neurotransmisor (Rodríguez Díaz et al. 2005, Hazell et al. 2007, Takeuchi et al. 2006).

El aumento en la liberación del glutamato estriatal ha sido considerado como un factor relevante para la progresión de la enfermedad de Parkinson (progresión por excitotoxicidad). A pesar de que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos estriatales aumenta el glutamato estriatal, el hecho de no encontrar denervación dopaminérgica en el estriado ni pérdida de células dopaminérgica en la sustancia negra después de la activación de la transmisión glutamatérgica estriatal sugiere que el glutamato estriatal no es un factor relevante para la progresión de la degeneración dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, estos datos no descartan la hipótesis excitotóxica de la enfermedad de Parkinson. El glutamato puede actuar en otras partes de las células dopaminérgicas, y sobre todo en la sustancia negra, donde el soma de las neuronas recibe abundantes aferencias glutamatérgicas provenientes principalmente del subtálamo y del núcleo pedúnculo pontino (Rodríguez-Oroz et al. 2001). Además, la excitotoxicidad podría estar involucrada en la pérdida de otros grupos celulares que también degeneran en la enfermedad de Parkinson, y particularmente, como los datos actuales sugieren, en la degeneración neuronal de los núcleos intralaminares del tálamo. Tanto la degeneración neuronal del estriado como la de los núcleos intralaminares del tálamo fueron acompañados de microgliosis, datos que sugieren que la respuesta inflamatoria local en el estriado se acompaña de otra respuesta similar a distancia (tálamo).

En estudios anteriores se ha comunicado la existencia de degeneración celular en los núcleos intralaminares del tálamo de los pacientes

parkinsonianos (Henderson 2000, Smith 2009). Esta degeneración también ha sido observada en animales de experimentación sometidos a una pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida mediante la administración de neurotóxicos selectivos (Aymerich et al. 2006, Ghorayeb et al. 2002, Sedaghat et al. 2009). Se ha sugerido que la denervación dopaminérgica del tálamo activa la degeneración de las células talámicas (degeneración por denervación), pero la relación entre la pérdida de células talámicas y nigrales **en la EP** sigue siendo un tema de debate (Smith et al. 2009, Henderson et al. 2005). Tomado en conjunto, el aumento de glutamato estriatal encontrado después de la disminución de la transmisión dopaminérgica estriatal y, la degeneración talámica observada después del aumento del glutamato estriatal, sugiere otro posible mecanismo para la degeneración talámica, que se resume en: degeneración de las células dopaminérgicas (inducida por causas a determinar) → denervación dopaminérgica estriatal → aumento sostenido de la liberación de glutamato estriatal → excitotoxicidad retrógrada en las neuronas tálamo-estriatales de los núcleos intralaminares (inducida por los receptores de kainato de las terminales presinápticas o receptores AMPA / NMDA de axones u oligodendrocitos). Esta posibilidad no implica necesariamente que la degeneración talámica sólo pueda comenzar en las etapas avanzadas de la enfermedad de Parkinson. Los signos motores de la enfermedad de Parkinson aparecen por primera vez cuando alrededor de un 70-80% de dopamina estriatal se ha perdido (Marsden et al. 1990, Dauer et al. 2003, Greffard et al. 2006) y los mecanismos compensatorios dopaminérgicos se han activado (Obeso et al. 2004). Así, las células de los núcleos intralaminares del tálamo podrían comenzar a degenerar en las primeras etapas de la progresión de la enfermedad de Parkinson cuando los mecanismos compensatorios son todavía capaces de prevenir los trastornos funcionales característicos de esta enfermedad neurodegenerativa.

Los datos actuales sugieren la excitotoxicidad retrógrada como un posible mecanismo para explicar la degeneración de los núcleos intralaminares del tálamo en la enfermedad de Parkinson. Estos núcleos se han involucrado en diferentes funciones sensitivo-motoras (atención multimodal, la detección de estímulos inesperados...) (Smith et al. 2009) a menudo perturbadas en enfermedad de Parkinson (Smith et al. 2009, Sabate 2008 et al., Lanciego et al. 2009), el control de la excitotoxicidad retrógrada puede ser útil para la prevención sintomática de la progresión de esta enfermedad.

Experimentos 5 a 8: Interacción estriatal de la dopamina, el glutamato y el ácido ascórbico como mecanismo para la degeneración retrograda.

A pesar de los numerosos estudios practicados durante los últimos 20 años, las acciones fisiológicas del glutamato, la dopamina y el ácido ascórbico todavía no se entienden completamente. Una de las razones son las complejas interacciones que presentan estas moléculas y que limitan la comprensión de su actividad cuando ésta es estudiada por separado. El glutamato extracelular activa el intercambiador glutamato-ácido ascórbico, donde la recaptación de glutamato se acompaña de la liberación de ácido ascórbico, induciendo una variación rápida y marcada de la concentración extracelular de ácido ascórbico (Cammack et al. 1991, Ghasemzadeh et al. 1991, O'Neill et al. 1984, Pierce y Rebec 1993). El ácido ascórbico puede prevenir la oxidación de la dopamina, lo que aumenta la difusión extracelular de la dopamina y su efecto post-sináptico (Rebec y Wang 2001). También hay evidencias que sugieren que la dopamina modula la acción del glutamato sobre las neuronas del estriado (Maura y otros, 1988), y que el propio glutamato modula la liberación de la dopamina de las células nigro-estriatales (Borland y Michael 2004, Kulagina et al. 2001, Wagner et al. 2005, Wüllner et al. 1994). Dado que la información disponible es dispersa, la relevancia de las interacciones dopamina-glutamato-ácido ascórbico para la actividad estriatal aún no es bien comprendida.

Un conocimiento más profundo de las interacciones dopamina-glutamato-ácido ascórbico también facilitaría la comprensión de los mecanismos implicados en la degeneración celular en los trastornos de los ganglios basales como la enfermedad de Parkinson. Como ya hemos comentado en distintas ocasiones, se ha sugerido que la degeneración de las células dopaminérgicas nigroestriatales en la enfermedad de Parkinson está activada por una liberación excesiva de glutamato (excitotoxicidad) (During et al. 1995, Jenner y Olanow 1998, Martí et al. 2000, Meshul et al. 1999, Obrenovitch y Richards 1995, Olanow y Tatton 1999, Rodríguez et al. 1998) neuronal (Di Loreto et al. 1992, Iribe et al. 1999, Lavoie y Parent 1994, Nauta y Cole 1978, Nijijima y Yoshida 1988, Parent y Hazrati 1995, Rinvik y Ottersen 1993, Scarnati et al. 1986) o glial (Araque et al. 2000, Araque et al. 1999, Jabaudon et al. 1999, Morales et al. 2009, Pasti et al. 1997, Rodríguez Díaz et al. 2005), por la liberación excesiva de ácido ascórbico desde los astrocitos (Rebec y Wang 2001) y por la propia síntesis de la dopamina o de sus derivados (principalmente quinonas/semiquinonas) en las neuronas nigroestriatales

(Newcomer et al. 1993, Rescigno et al. 1998). Sin embargo, la información disponible es difusa, lo que requiere estudios específicos sobre las interacciones dopamina-glutamato-ácido ascórbico en modelos animales de la EP. Dado que estos datos asocian el glutamato, la dopamina y la glía con la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas, y que todos estos aspectos estaban contemplados desde el principio en los objetivos de la Memoria, se consideró la conveniencia de ampliar los estudios de la memoria para incluir la acción del ácido ascórbico.

Por tanto, el conjunto de trabajos que se comentarán a continuación tienen como objetivo central el ampliar la información acerca de las interacciones entre la dopamina, el ácido ascórbico y el glutamato en el estriado de ratas normales y en el estriado de ratas a las que se les ha degenerado parcial la innervación dopaminérgica. Además, se estudiaron las posibles diferencias de las interacciones dopamina - ácido ascórbico - glutamato en los dos principales centros de los ganglios basales estudiados en esta Memoria, el estriado (en las terminales dopaminérgicas y glutamatérgicas) y la sustancia negra (en las terminales glutamatérgicas y los somas de las células dopaminérgicas). En esencia, los experimentos que se describirán evalúan los efectos del glutamato, la dopamina y el ácido ascórbico, administrados en el medio extracelular por microdiálisis inversa, en la concentración extracelular de la dopamina y el glutamato, registrados por microdiálisis directa. También fue estudiada la influencia de la levodopa (el tratamiento más eficaz para el control sintomático de la enfermedad de Parkinson) en la liberación de la dopamina y del glutamato en un modelo animal de los estadios iniciales de la EP (Rodríguez Díaz et al. 2001, Rodríguez et al. 2001). A continuación se hará una breve descripción de los métodos utilizados en los experimentos del 5 al 8, para luego describir por separado el diseño y los resultados de cada uno de estos experimentos. Al término del cual se presentará una discusión globalizadora del conjunto de experimentos del estudio sobre la interacción dopamina-ácido ascórbico-glutamato.

❖ **Metodología común.**

Los experimentos se llevaron a cabo en machos Sprague-Dawley que pesaban entre 300-350 g. Nueve ratas, tras ser anestesiadas con ketamina y xilazina, fueron inyectadas intraventricular (en el tercer ventrículo) con una única dosis de 6-OHDA (250 µg de 6-OHDA en 12 µl de vehículo a 2 µl/min) para la obtención del modelo animal con células dopaminérgicas degeneradas que fueron utilizadas en este estudio. Este procedimiento ha sido previamente descrito en la sección general de Material y Métodos (Rodríguez Díaz et al. 2001, Rodríguez et al. 2001).

La microdiálisis se realizó por los procedimientos también relatados con anterioridad y siguiendo los procedimientos previos (García Dopico et al. 2004, Rodríguez Díaz et al. 2005). La cánula de diálisis fue introducida en el estriado o en la sustancia negra. Las cánulas fueron perfundidas con solución ringer (2.0 μ l/min) y después de descartar las muestras de los primeros 150 minutos, se procedió a recoger el dializado cada 10 o 20 minutos según experimento.

El glutamato y la glutamina se determinaron mediante HPLC con detección fluorimétrica y siguiendo el procedimiento referido anteriormente (Rodríguez Díaz et al. 2005), y la dopamina y el DOPAC se determinaron por HPLC con detección electroquímica (Afonso et al. 1990, Rodríguez y Castro 1991). Para evitar la oxidación de la dopamina, un μ l las muestras fue introducida en el eluyente del cromatógrafo mediante inyección "on line". Con el fin de alcanzar una alta resolución temporal, la dopamina y el DOPAC se detectaron con un potencial de 0,3 V, evitando así la detección otras sustancias cuyos tiempos de elución produjera solapamientos con los metabolitos objetivo. El excedente de cada muestra fue almacenado para la ulterior determinación de los aminoácidos.

Experimento 5: Efecto del glutamato en la transmisión dopaminérgica estriatal y nigral

❖ Metodología.

La influencia de glutamato sobre la dopamina y el DOPAC extracelular fue estudiada en el estriado (en un grupo de 9 ratas) y en la sustancia negra (en un grupo de 5 ratas) mediante la perfusión de una solución 1 mM de glutamato en ringer durante 1 hora por microdiálisis reversa. La dopamina y el DOPAC extracelular fueron recuperados por microdiálisis directa cada 20 minutos, y cuantificados "on line" por HPLC con detector electroquímico.

❖ Resultados.

El glutamato indujo un aumento transitorio de la concentración extracelular de dopamina ($F(9) = 4.12$, $p < 0,001$) y una disminución persistente del DOPAC ($F(9) = 49.27$, $p < 0,001$) en el estriado (figura 19). El efecto fue diferente en la sustancia negra (figura 20) donde el glutamato aumentó la dopamina ($F(5) = 11.93$, $p < 0,001$) y el DOPAC ($F(5) = 3,74$, $p < 0,01$).

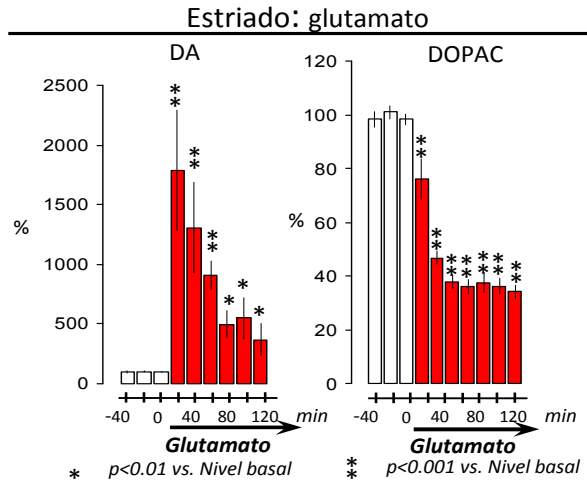


Figura 19: Efecto del glutamato sobre el nivel extracelular de dopamina y DOPAC en el estriado. Los datos se muestran como porcentajes de la media de las tres muestras (40 min) que precedieron a la perfusión de glutamato en cada experimento (media \pm error estándar).

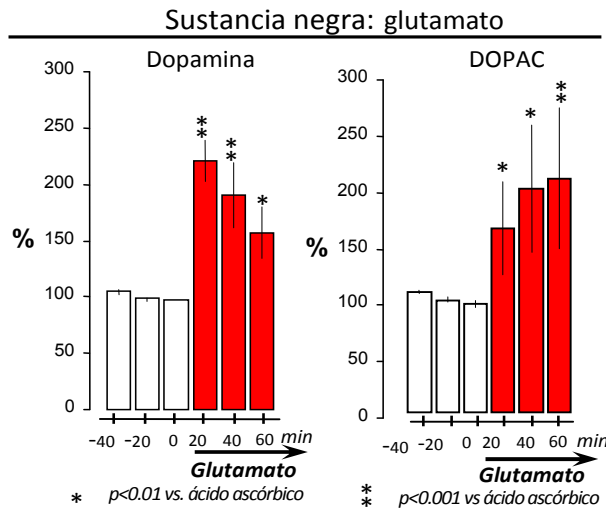


Figura 20. Efecto del glutamato en el nivel extracelular de dopamina y DOPAC en la sustancia negra. Los datos se muestran como porcentajes de la media de las tres muestras (40 min) que precedieron a la perfusión del glutamato en cada experimento (media \pm error estándar).

Experimento 6: Acción del ácido ascórbico en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica estriatal.

❖ **Metodología.**

La influencia del ácido ascórbico sobre la dopamina y el DOPAC fue estudiada en el estriado en un grupo de 9 ratas mediante la administración vía microdiálisis reversa de 0,4 mM de ácido ascórbico en ringer. Teniendo en cuenta que la concentración extracelular de ácido ascórbico en el estriado de ratas anestesiadas oscila entre 0.2-0.3 mM (Basse-Tomusk y Rebec 1991), se seleccionó una dosis de ácido ascórbico capaz de inducir un incremento de la concentración basal de ácido ascórbico que no sobrepase sus límites fisiológicos normales en el medio extracelular (Rebec et al. 2005).

La dopamina y el DOPAC del fluido de microdiálisis que cuantificó "*on line*" mediante HPLC por detección electroquímica, mientras que el glutamato y la glutamina se cuantificó "*off line*" mediante HPLC con detección fluorimétrica (la resolución temporal de ambas fue de 20 minutos).

❖ **Resultados.**

El ácido ascórbico indujo en el estriado un aumento transitorio de la concentración de dopamina extracelular (figura 21, $F(9) = 4.02$, $p < 0,001$) y una disminución progresiva del DOPAC (figura 21, $F(9) = 3.70$, $p < 0,01$). La administración de ácido ascórbico no indujo cambio alguno en la concentración extracelular de glutamato ($F(7) = 0,372$, $p = 0,913$), tal y como se muestra en la figura 22A, pero si produjo un aumento tardío de la glutamina que no alcanzó el valor estadístico ($F(7) = 2,070$, $p = 0,07$; figura 22C).

Estriado: Ácido ascórbico

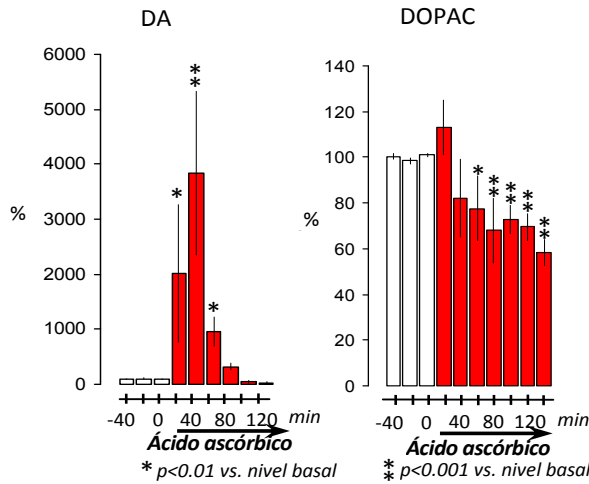


Figura 21: Efecto del ácido ascórbico en el nivel extracelular de dopamina y DOPAC en el estriado. Los datos se muestran como porcentajes de la media de las tres muestras (40 min) que precedieron a la perfusión de ácido ascórbico en cada experimento (media \pm error estándar).

Estriado

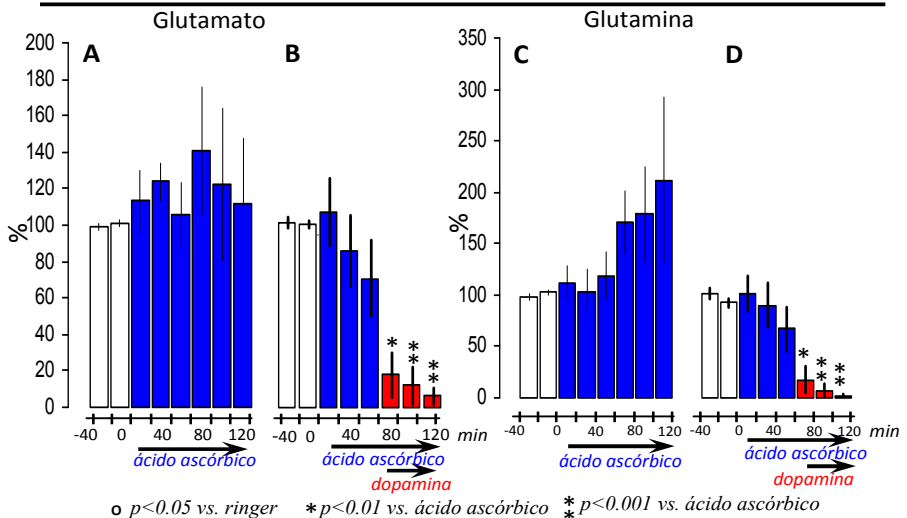


Figura 22: Efecto del ácido ascórbico y de la dopamina sobre el nivel extracelular de glutamato y glutamina en el estriado. Los datos se muestran como porcentajes de la media de las tres muestras (40 min) anteriores a la perfusión del ácido ascórbico en cada experimento (media \pm error estándar).

Experimento 7: Efecto de la dopaminérgica en la transmisión glutamatérgica estriatal.

❖ Metodología.

La influencia de la transmisión dopaminérgica sobre el glutamato y la glutamina se estudió mediante la administración por microdiálisis reversa de 3,33 mM de dopamina durante 60 minutos o 0,1 μ M de haloperidol a lo largo de 120 minutos. Ambos experimentos se llevaron a cabo en 2 grupos de 8 ratas que fueron anestesiadas con hidrato de cloral. La cuantificación del glutamato y glutamina en el dializado se realizó por el método de HPLC/detección fluorimétrica detallado en la sección general de Material y Métodos. La solución ringer utilizada durante el período anterior a la administración de dopamina contenía ácido ascórbico (0,4 mM) al igual que la solución perfundida de dopamina, con la finalidad de evitar la oxidación de la dopamina. El haloperidol se disolvió inicialmente en ácido acético y luego se diluyó en ringer (1 mM haloperidol en 19,1 mM de ácido acético / ringer; pH: 6,0).

❖ Resultados.

Como se muestra en las figuras 22B y 22D presentadas arriba, la concentración extracelular de glutamato y glutamina no cambió durante la perfusión de ácido ascórbico. Sin embargo, la adición de dopamina a la solución produjo un descenso rápido y marcado en la concentración extracelular de glutamato ($F(8) = 14,53$, $p < 0,001$; figura 22B) y de glutamina ($F(8) = 17,30$, $p < 0,001$; figura 22D). El efecto opuesto se observó cuando los receptores de dopamina fueron bloqueados con haloperidol, circunstancia que aumentó el glutamato (véase lado izquierdo de la figura 23) y la glutamina (véase el lado derecho de la figura 23).

*

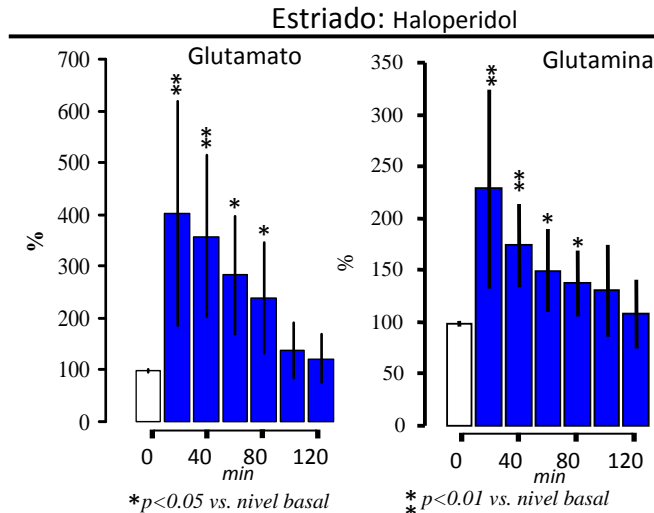


Figura 23: Efecto del haloperidol sobre el nivel extracelular de glutamato y glutamina en el estriado. Los datos se muestran como porcentajes del valor calculado de la muestra anterior a la administración de haloperidol (media \pm error estándar).

Experimento 8: Efecto de la levodopa en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica estriatal de ratas denervadas con 6-OHDA.

❖ Metodología.

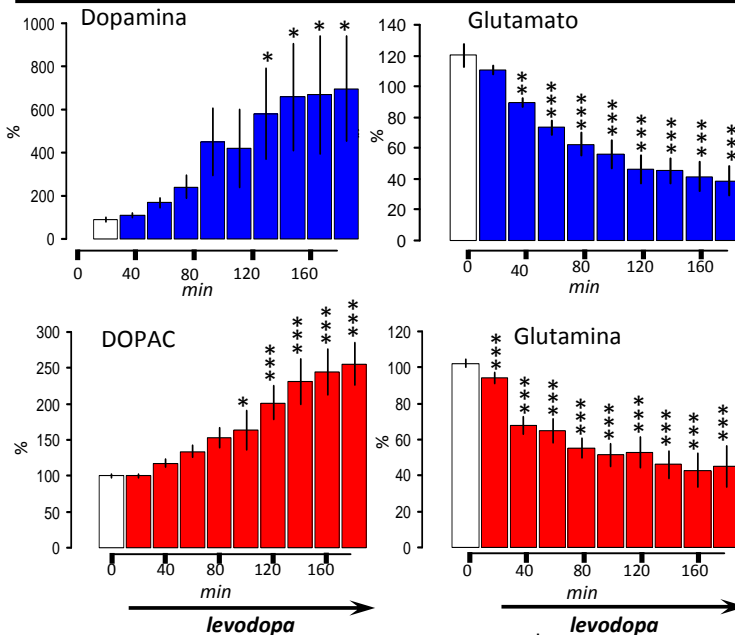
La relevancia de la interacción dopamina-glutamato para la acción de la levodopa en la enfermedad de Parkinson fue analizada en ratas a las que previamente se les había degenerado una parte importante de la inervación dopaminérgica del estriado. Para ello se administró levodopa a ratas con una degeneración dopaminérgica parcial (inducida mediante la administración de 6-OHDA en el tercer ventrículo) similar a la observada en la enfermedad de Parkinson (Rodríguez Díaz et al. 2001, Rodríguez et al. 2001). Después de probar diferentes dosis de levodopa, se utilizó la dosis de 100 mg/kg debido a que es la menor dosis capaz de activar la motilidad y aumentar la concentración extracelular de dopamina en animales con degeneración moderada bilateral del sistema de dopaminérgico nigroestriatal (Abercrombie et al. 1990, Brannan et al. 1997, Rodríguez Díaz et al. 2001, Thornburg y Moore, 1975). La acción de la levodopa en el nivel estriatal de la dopamina, el DOPAC, el glutamato y la glutamina fue estudiada por medio de microdiálisis reversa en un grupo de 9 ratas lesionadas con 6-OHDA a las que se inyectó, tras 150 minutos de espera y una vez los niveles extracelulares de dopamina se estabilizaron, en primer lugar benserazida (40 mg / kg; ip) y 20 minutos más tarde levodopa (100 mg / kg; ip). La concentración extracelular de dopamina y de DOPAC fue monitorizada "on line" mediante HPLC con

detector electroquímico, mientras que el glutamato y la glutamina fueron cuantificados "off line" por HPLC por detección fluorimétrica (1 µl de 40 µl del fluido de microdialísis recogidos cada 20 minutos fue utilizado para la cuantificación "on line" de la dopamina y del DOPAC y 10 µl se precisaron para la cuantificación "off line" del glutamato y de la glutamina). Estas determinaciones químicas se realizaron en las muestras perfundidas recolectadas cada 20 minutos, comenzando la colecta de muestras 80 minutos antes de la administración de levodopa y continuándola durante 200 minutos después de la levodopa.

◆ Resultados.

La administración intraperitoneal de levodopa aumentó el nivel extracelular de dopamina ($F(9) = 2.13, p < 0,05$) y DOPAC ($F(9) = 8.84, p < 0,001$) en el estriado (figura 24 lado izquierdo) de ratas lesionadas con 6-OHDA. El estudio de la transmisión glutamatérgica en las mismas muestras de dializado mostraron una disminución marcada de glutamato ($F(9) = 17.23, p < 0,001$) y glutamina ($F(9) = 9.44, p < 0,001$) durante la administración de levodopa (figura 24, lado derecho).

Estriado: administración de levodopa a ratas lesionadas con 6-OHDA



* $p < 0.05$ vs. ringer * $p < 0.01$ vs. ácido ascórbico * $p < 0.001$ vs. ácido ascórbico

Figura 24: Efecto de la levodopa en el nivel extracelular de la dopamina, el DOPAC, la glutamina y el glutamato en un estriado denervado. Los datos se muestran como porcentajes del valor calculado justo antes de la perfusión de la levodopa (media \pm error)

Discusión de los experimentos 5 al 8

Los datos presentados muestran una interacción extracelular tripartita entre el glutamato, la dopamina y el ácido ascórbico, interacción por la cual el glutamato disminuye la recaptación de dopamina, la dopamina disminuye la liberación de glutamato, y del ácido ascórbico facilita la difusión de dopamina. La transmisión dopaminérgica disminuyó la transmisión glutamatérgica en el estriado, donde el nivel extracelular de glutamato y glutamina disminuyó después de la administración de dopamina o levodopa, y aumentó después del bloqueo de los receptores dopaminérgicos con haloperidol.

El efecto del glutamato sobre la transmisión dopaminérgica fue diferente en el estriado (aumenta dopamina y disminuye DOPAC), y en la sustancia negra (aumenta dopamina y DOPAC). La interacción dopamina-glutamato también fue estudiada en animales con una degeneración parcial de las células dopaminérgicas. La administración de ácido ascórbico en el estriado aumentó la dopamina, disminuyó el DOPAC, y no mostró ningún efecto sobre el glutamato y la glutamina.

En el estriado, la perfusión de glutamato aumentó la concentración extracelular de dopamina y disminuyó la concentración de DOPAC. El aumento de dopamina podría ser producto de una facilitación en la liberación de dopamina (Borland y Michael 2004, Kulagina et al. 2001, Wagner et al. 2005, Wüllner et al. 1994, Rodríguez et al. 2006) o bien una inhibición de la recaptación de dopamina. Estudios previos de microdiálisis muestran un aumento de dopamina después de la administración de agonistas de los receptores de glutamato, sugiriendo la facilitación en la liberación de la dopamina como el mecanismo más probable (Bruton et al. 1999, Verma y Moghaddam 1998). Sin embargo, la disminución de DOPAC observada aquí (y no estudiado en los trabajos previos) también sugiere la inhibición de la recaptación de la dopamina como posible mecanismo (administración de glutamato → decrece recaptación de dopamina → aumenta dopamina extracelular y disminuye dopamina intracelular → disminuye DOPAC que no puede ser sintetizado en el medio extracelular). Aunque esta posibilidad es compatible con los datos anteriores que muestran una inhibición del transportador de dopamina en sinaptosomas estriatales tras la administración de agonistas de los receptores glutamatérgicos (Page et al. 2001), muchas variables sinápticas podrían estar involucradas en la modulación del DOPAC

extracelular (Wallace y Traeger 2012), y cualquier conclusión a partir de los datos disponibles podría ser prematura.

La distribución subcelular de la dopamina y los mecanismos implicados en su liberación son probablemente diferentes en el soma (sustancia negra) y en las terminales (estriado) de las células dopaminérgicas nigro-estriatales. En el estriado, la mayoría de dopamina se encuentra en las vesículas sinápticas, desde donde se libera en respuesta a la entrada de Ca^{2+} inducida por la llegada del potencial de acción a las terminales dopaminérgicas. En la sustancia negra, la mayoría de la dopamina se encuentra en el citosol desde donde puede ser liberada por la activación reversa del transportador de dopamina (Eshleman et al. 1994, Falkenburger et al. 2001, Ingram et al. 2002) ,aunque se ha publicado la posibilidad de que una pequeña cantidad de dopamina liberada pueda proceder de unas pocas vesículas sinápticas situadas en las dendritas, (Beckstead et al. 2004, Eshleman et al. 1994, Geffen et al. 1976, Jaffe et al. 1998). El incremento del DOPAC observado después de la administración nigral de glutamato sugiere que el glutamato facilita la liberación de la dopamina en este centro (en lugar de inhibir la recaptación de dopamina como en el estriado). Esta posibilidad está de acuerdo con estudios previos realizados en rodajas de cerebro donde los agonistas de los receptores de glutamato estimulaban la liberación de dopamina en la sustancia negra cuantificada por técnicas amperométricas (Jaffe et al. 1998), por la liberación de dopamina tritiada (Araneda y Bustos 1989), y por las acciones post-sinápticas de la dopamina (Beckstead et al. 2004). En cualquier caso, lo que demuestran los datos presentes es que la relación glutamato-dopamina cambia en función del núcleo del cerebro estudiado, y difiere en el soma celular y en las terminales sinápticas de las células nigro-estriatales.

La perfusión de dopamina en el estriado disminuyó la concentración extracelular de glutamato. Un efecto similar se observó después de inducir la liberación endógena de dopamina con inyecciones periféricas de levodopa. El bloqueo de los receptores dopaminérgicos estriatales con haloperidol produjo el efecto contrario, es decir, aumentó la concentración extracelular de glutamato. Dado que la disminución de glutamato inducida por la perfusión de dopamina o por la administración de levodopa fue acompañado por una disminución de glutamina, y que el aumento de glutamato inducido por la perfusión estriatal de haloperidol fue acompañado por un aumento de la glutamina, los datos sugieren que la dopamina inhibe la liberación estriatal de glutamato. Hay evidencias electrofisiológicas (Calabresi et al. 1993, García-

Muñoz et al. 1991), neuroquímicas (Carlsson y Carlsson 1990, Mitchell y Doggett 1980, Rowlands y Roberts 1980) y ultraestructurales (Fisher et al. 1994, Moss y Bolam 2008) de la existencia de receptores dopaminérgicos en las aferencias glutamatérgicas del estriado. Por lo tanto, la dopamina podría inhibir la liberación de glutamato tras la estimulación de receptores de dopamina situados en las fibras aferentes glutamatérgicas del estriado, posibilidad que también podría explicar la inhibición de la liberación de glutamato observado en los sinaptosomas estriatales incubados con dopamina (Maura et al. 1988). Teniendo en cuenta que hay receptores de dopamina D2 en las sinapsis glutamatérgicas del estriado cuya estimulación disminuye la liberación del glutamato en preparaciones in vitro (Flores-Hernández et al. 1997; Hsu et al. 1995; Maura et al. 1988, Mercuri et al. 1985, Surmeier et al. 2007), el incremento de dopamina observado después de la administración del haloperidol (antagonista de los receptores de dopamina D2) sugiere que la modulación dopaminérgica de la liberación de glutamato involucra los receptores dopaminérgicos D2 del estriado.

La administración de ácido ascórbico aumentó el nivel de dopamina y disminuyó el nivel de DOPAC, sin mostrar efectos sobre el glutamato y la glutamina. Debido a que el DOPAC es un metabolito intracelular de la dopamina (Roffler-Tarlov et al. 1971, Westerink et al. 1984), una inhibición de la recaptación de dopamina podría explicar tanto el aumento de dopamina como la disminución de DOPAC. Sin embargo, el nivel extracelular de DOPAC se ha asociado con diferentes variables sinápticas (Wallace y Traeger 2012) que a menudo han sido utilizadas para tratar de explicar la variabilidad de la respuesta del DOPAC a diferentes inhibidores del transportador de la dopamina (Karoum et al. 1994, Zetterstrom et al. 1988). Cualquiera de estas variables (síntesis directa de DOPAC desde la dopamina neosintetizada, activación de la liberación de DOPAC...) también podrían estar involucrados en la respuesta dopaminérgica a la administración de ácido ascórbico. La prevención de la oxidación de la dopamina incrementa la difusión extracelular de moléculas de dopamina no oxidadas (Rebec y Wang 2001) que son las únicas que pueden ser detectadas por el procedimiento electroquímico que es utilizado aquí. Por lo tanto, la acción del ácido ascórbico en la dopamina extracelular podría ser consecuencia del bloqueo de la oxidación dopaminérgica en lugar de ser el resultado de cambios en la recaptación o en la liberación de la dopamina. Sin embargo, la disminución del DOPAC sugiere que probablemente este mecanismo no sea la única acción del ácido

ascórbico en la transmisión dopaminérgica. La reducción de la oxidación de la dopamina probablemente aumenta la dopamina extracelular y la estimulación presináptica de los receptores de dopamina, lo que consecuentemente disminuiría la síntesis de dopamina y DOPAC (Rodríguez y Castro 1991, Arbilla y Langer 1981). Debido a que este efecto fue moderado (la concentración de DOPAC sólo fue del 80% del nivel basal), probablemente pudo haberse alterado la síntesis de dopamina sin inducir cambios en la transmisión glutamatérgica similares a los observados tras la administración directa de dopamina.

La inervación glutamatérgica cortico-estriatal de las espinas de las neuronas espinosas de tamaño medio es generalmente considerada como la sinapsis principal del estriado. Esta sinapsis está modulada postsinápticamente por las terminales dopaminérgicas que inervan el cuello de estas espinas (Frotscher et al. 1981, Smith et al. 1998, Somogyi et al. 1981). Además, la dopamina puede difundir unas micras a través del medio extracelular (Cragg y Rice 2004, Moss y Bolam 2008, Rice y Cragg 2008) induciendo la modulación presináptica de las terminales glutamatérgicas comentado anteriormente. El reservorio extracelular de glutamato incrementó la concentración extracelular de dopamina, lo cual sugiere que la difusión extrasináptica de glutamato también puede modular la sinapsis dopaminérgica. Todos estos datos sugieren que las terminales glutamatérgicas y dopaminérgicas presentan una modulación mutua pre-sináptica en el estriado, donde el ácido ascórbico es una variable adicional a añadir en esta interacción DA-GLU pre-sináptica. Como se mencionó anteriormente, el ácido ascórbico promueve la difusión extracelular de moléculas no oxidadas de dopamina, lo que podría mejorar la acción inhibitoria de la dopamina sobre la liberación de glutamato. Dado que el ácido ascórbico es liberado durante la recaptación de glutamato por el intercambiador glutamato-ascorbato (Cammack et al. 1991, Ghasemzadeh et al. 1991, O'Neill et al. 1984, Pierce y Rebec 1993), la inhibición de la sobre el glutamato puede ser particularmente efectiva cuando se incrementa la liberación de glutamato. Por lo tanto, el glutamato, la dopamina y el ácido ascórbico deben considerarse siempre como una unidad tripartita que modula las sinapsis glutamatérgicas cortico-estriatales. El glutamato liberado desde aferentes estriatales promueve la liberación de dopamina desde las neuronas nigroestriatales y la liberación de ácido ascórbico desde los astrocitos, aumentando así la acción dopaminérgica sobre la transmisión glutamatérgica. Estas acciones combinadas podría ser necesaria

para mantener la función de glutamato en parámetros fisiológicos, justificando la actividad como transmisor de volumen de la dopamina (Rodríguez et al. 2006) y el efecto descrito para el comportamiento del ácido ascórbico estriatal (Rebec y Wang, 2001).

La interacción glutamato-dopamina-ácido ascórbico también podría ser relevante para la neurodegeneración en los trastornos de los ganglios basales. Una liberación de glutamato (excitotoxicidad) y dopamina (toxicidad oxidativa) excesiva se han relacionado con la progresión de los trastornos de los ganglios basales como la enfermedad de Parkinson o de Huntington. Cualquier circunstancia que impidiera la retroalimentación inhibitoria de la dopamina sobre la liberación del glutamato promovería la acción excitotóxica del glutamato estriatal. Esto podría ocurrir en la enfermedad de Parkinson donde tiene lugar una denervación dopaminérgica del estriado antes de la degeneración típica de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Damier et al. 1999, Rodríguez et al. 2001). El presente estudio sobre la relación dopamina - glutamato después de la degeneración parcial de la innervación dopaminérgica del estriado sugiere que las terminales dopaminérgicas que sobreviven a la degeneración parcial de células dopaminérgicas en la enfermedad puede controlar también la transmisión glutamatérgica estriatal. La disminución en la recaptación de glutamato ha sido relacionada con la degeneración de las células del estriado observada en la enfermedad de Huntington (Beal et al. 1986.,; Coyle y Schwarcz 1976, Guidetti et al. 2006). En este caso, el aumento extracelular de glutamato podría bloquear la recaptación de la dopamina, promoviendo de esta forma a un aumento excesivo de dopamina extracelular que tras oxidarse originaría radicales libres (André et al. 2010, Coyle y Puttfarcken 1993) y metabolitos capaces de estimular los receptores de glutamato (Aizenman et al. 1990, Newcomer et al. 1993; Rosenberg et al. 1991) e induciendo finalmente la muerte de las células estriatales característica de esta enfermedad.

En resumen, la evidencia presentada aquí sugiere que el glutamato promueve la acción extracelular de la dopamina (inhibiendo su recaptación y evitando su oxidación), mientras que la dopamina inhibe la acción extracelular del glutamato (inhibiendo su liberación). Esta interacción glutamato - dopamina puede ser crítica para el funcionamiento normal del estriado, y su interrupción podría promover la degeneración de las células en diferentes trastornos de los ganglios basales.

BLOQUE TEMÁTICO 2: REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN GLIAL DE AGENTES NEUROACTIVOS EN LA SUSTANCIA NEGRA.

Introducción

Este bloque de experimentos hace referencia al estudio de los mecanismos implicados en la liberación glial de sustancias de bajo peso molecular con capacidad para modular la vulnerabilidad neural. Distintos estudios básicos y clínicos sugieren como uno de los agentes directamente relacionados con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas los mecanismos inflamatorios. Los estudios realizados en animales muestran que la activación de la microglía (generalmente inducida por la administración de citoquinas pro-inflamatorias en animales o por la elevación plasmática en humanos de citoquinas pro-inflamatorias, tales como la IL-1 β , IL-6 o el TNF- α) puede desencadenar degeneración dopaminérgica. Los mecanismos por los cuales la microglía genera la muerte de las neuronas del entorno inmediato han sido estudiados profusamente durante los últimos 15 años. En la respuesta inflamatoria se generan cambios en la osmolaridad local que podrían por sí mismos, inducir alteraciones en la liberación de agentes neuroactivos. La influencia de la osmolaridad extracelular en la degeneración neuronal y en la excitotoxicidad han sido escasamente estudiados.

Este bloque se orientó inicialmente hacia el estudio de la posible acción de los cambios de osmolaridad en la liberación glial de agentes neuroactivos. Asumiendo que esta acción tóxica de los agentes gliales es mayor cuando son liberados en regiones próximas al soma de las neuronas dopaminérgicas que cuando son liberados en el estriado (circunstancia verificada en los experimentos del bloque 1), los estudios fueron realizados en la sustancia negra. Para inducir de forma selectiva alteraciones locales en la osmolaridad extracelular se utilizó la microdiálisis reversa. La influencia de la osmolaridad extracelular en la liberación glial de sustancias de bajo peso molecular fue evaluada mediante microdiálisis directa. Los productos gliales estudiados en los experimentos de este bloque fueron la taurina (aminoácido con importante acción osmorreguladora y que puede actuar como un neurotransmisor inhibitorio en la sustancia negra), el glutamato (aminoácido excitador que, como se comentó arriba, se ha asociado a la muerte por excitotoxicidad de las neuronas dopaminérgicas) y el ATP (neuromodulador que puede ser liberado por las células gliales y cuyo papel en la sustancia negra permanece escasamente estudiado).

Puesto que, tanto el ATP (Chen et al. 1999, Mitchell et al. 1998, Rothstein et al. 1996, Schwiebert et al. 1995) como el glutamato (Tuz 2001, Mongin et al. 2005, Goude 2004 et al., Franco et al. 2000) se encuentran frecuentemente involucrados en la osmorregulación celular, y que la liberación de estas sustancias al medio extracelular podría ser una de las consecuencias de la respuesta osmorregulatoria (Basarsky et al. 1999, Darby et al. 2003, Garcia Dopico et al. 2004, Menendez et al. 1989, Pasantes-Morales 1984), ambas sustancias fueron incluidas en el estudio. Así, los siguientes experimentos se centraron en el estudio de la acción de los cambios osmolares sobre los niveles extracelulares extrasinápticos de taurina, ATP y glutamato.

Experimento 9: Acción de la hipo-osmolaridad en el reservorio de taurina extracelular extrasináptico de la sustancia negra.

❖ Metodología.

En este experimento se utilizaron 7 ratas machos de 300 grs. Los animales fueron anestesiados con las técnicas ya referidas, procediéndose a exponer la corteza cerebral e introducir una cánula de diálisis (2 mm de membrana de intercambio) en la sustancia negra. Los primeros 150 minutos de dializado de adaptación a la perfusión con una solución ringer iso-osmolar (285 mOsm) fueron descartados. A continuación se recogieron 30 minutos de dializado basal (285 mOsm) para, posteriormente, perfundir durante 5 minutos una solución hipo-osmolar de 230 mOsm. Tras 90 minutos de readaptación a la solución iso-osmolar se administró un segundo pulso hipo-osmolar de 180 mOsm durante 5 minutos, volviendo a continuación a la perfusión iso-osmolar durante 90 minutos. Este proceso se repitió una vez más para una solución hipo-osmolar de 130 mOsm. Durante todo el experimento se acumularon muestras de dializado cada 10 minutos, de los cuales se cuantificarían los niveles de taurina mediante HPLC con detector fluorimétrico.

❖ Resultados

La hipo-osmolaridad incrementó la concentración extrasináptica de la taurina de una manera dosis-dependiente, aumentando en un 60% después del primer pulso (230 mOsm), en un 350% tras el segundo pulso (180 mOsm) y en un 550% después del tercer pulso (130 mOsm). Salvo para estímulo de

mayor hipo-osmolaridad (130 mOsm), que mostró un pequeño aumento de taurina en el dializado obtenido de 5-15 minutos después del pulso hipo-osmolar, la respuesta de la taurina sólo se observó en el dializado obtenido durante la estimulación, desapareciendo completamente 5 minutos después del estímulo.

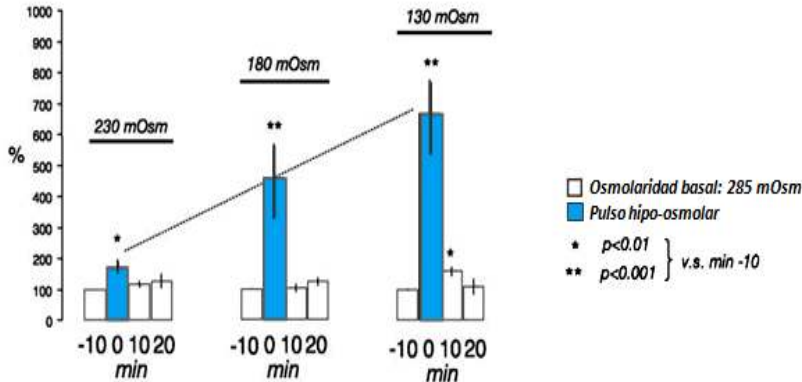


Figura 25. Incremento dosis dependiente de la taurina extrínica durante la perfusión de ringer hipo-osmótico (285 a 130 mOsm) en la sustancia negra. Los valores son porcentajes de los niveles basales 10 minutos antes de la administración del pulso hipo-osmótico (media \pm error estándar).

Experimento 10: Baja osmolaridad, concentración iónica y taurina extracelular en la sustancia negra.

❖ Metodología.

El objetivo de este experimento fue estudiar la acción de la baja concentración de iones en el efecto que la baja osmolaridad posee sobre la liberación de taurina. En este experimento se utilizaron 6 ratas de 300 gramos. Una vez anestesiadas, se procedió a introducir una cánula de diálisis (2 mm de membrana de intercambio) en la sustancia negra izquierda. Tras descartar los primeros 150 minutos del dializado de adaptación a la perfusión con una solución ringer iso-osmolar (285 mOsm), se recogieron 30 minutos de dializado iso-osmolar basal (285 mOsm). Posteriormente, se les administró dos pulsos hipo-osmolares sucesivos de 5 minutos de duración cada uno: el primero con una concentración baja de NaCl (88 mM) para obtener una osmolaridad de 180 mOsm, y el segundo con la misma baja concentración de NaCl, pero con su osmolaridad restaurada hasta la normal del LCR (285 mOsm) mediante la adición de 60 mM de cloruro de colina a la solución iso-osmolar de 88 mOsm. Entre ambos pulsos se volvió a perfundir la solución iso-osmolar durante 90 minutos. A lo largo de todo el experimento se

recogieron muestras de dializado por periodos de 10 minutos, procediéndose a continuación a cuantificar los niveles de taurina mediante las técnicas cromatográficas ya comentadas con HPLC de detección fluorimétrica.

❖ Resultados

El pulso hipo-osmolar de 180 mOsm aumentó la concentración de taurina, efecto que desapareció cuando la hipo-osmolaridad fue compensada con cloruro de colina (colina-Cl), demostrándose así que el aumento de la taurina extracelular es inducido por la baja osmolaridad y no por la baja concentración de iones.

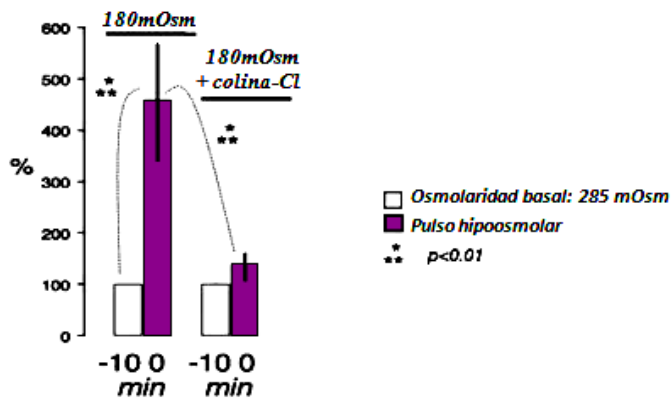


Figura 26. Inhibición de la respuesta de la taurina en la sustancia negra al sustituir el cloruro sódico omitido en la solución de perfusión por cloruro de colina. Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la administración del pulso hipo-osmolar (media \pm error estándar).

Experimento 11: La respuesta de la taurina a la hipo-osmolaridad depende de las condiciones basales de osmolaridad.

❖ Metodología

El objetivo de este experimento fue estudiar si la respuesta de la taurina a la hipo-osmolaridad es similar en condiciones fisiológicas que en condiciones de baja osmolaridad previa. Para este experimento se utilizaron dos grupos de 6 ratas machos de 300 grs. Los animales anestesiados y con la cánula de diálisis (2 mm de membrana de intercambio) insertada en la sustancia negra, fueron perfundidos con una solución ringer basal durante 150 minutos de adaptación. A continuación se recogieron 30 minutos de dializado basal y se procedió a administrar un pulso hipo-osmolar de 80 mOsm durante 5 minutos. En el primer grupo el pulso hipo-osmolar se perfundió cuando la

solución ringer basal tenía osmolaridad fisiológica (285 mOsm), mientras que en el segundo la solución ringer basal era hipo-osmolar (210 mOsm). Durante todo el experimento las muestras de dializado fueron recogidas cada 10 minutos, para ser posteriormente cuantificados los niveles de taurina mediante las técnicas cromatográficas comentadas con anterioridad.

❖ Resultados

La taurina aumentó en ambos casos, aunque la respuesta fue mayor en el grupo que comenzó a partir de una osmolaridad basal normal (285 mOsm) donde la diferencia entre el LRC artificial basal y el pulso hipo-osmolar era de 200 mOsm, que en el grupo cuya osmolaridad basal era más baja (con una diferencia de 130 mOsm). Estos resultados mostraron que la respuesta de la taurina a la hipo-osmolaridad se mantiene activa aún cuando la osmolaridad basal es más baja de lo normal.

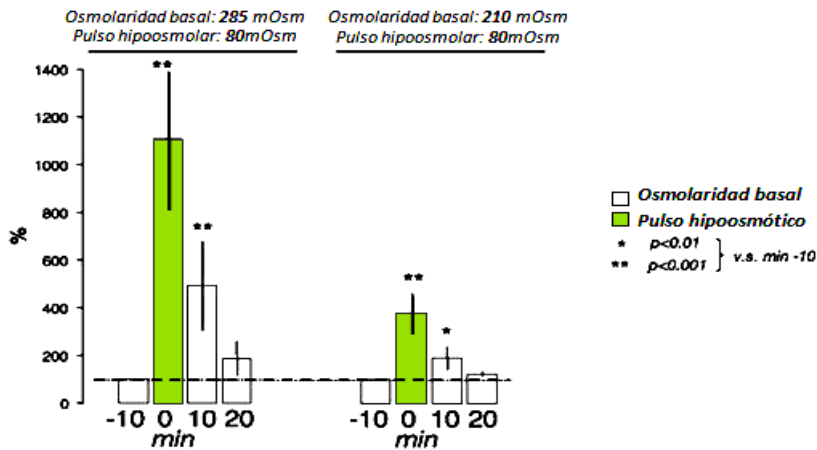


Figura 27. Respuesta de la taurina nigral a pulsos fuertemente hipo-osmolares (80 mOsm) durante la perfusión de ringer iso-osmótico (285 mOsm en la izquierda) y durante la perfusión de ringer ligeramente hipo-osmótico (210 mOsm en la derecha). Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la administración del pulso hipo-osmolar (media \pm error estándar).

Experimento 12: Acción de la hiper-osmolaridad en los niveles de taurina nigral extracelular.

❖ Metodología

El objetivo de este estudio fue evaluar si la taurina está también implicada en la adaptación a condiciones hiper-osmolares. El experimento se realizó con dos grupos de 5 ratas machos de 300 grs. A los animales anestesiados se les

introdujo la cánula de diálisis (2 mm de membrana de intercambio) en la sustancia negra. Se les perfundió una solución ringer de adaptación durante 150 minutos y se procedió a recoger 30 minutos de dializado basal. Posteriormente, se administró durante 5 minutos un pulso hiper-osmolar de 15 mOsm superior al nivel basal. En el primero grupo, la osmolaridad de la solución de LCR artificial basal estaba en el rango fisiológico (285 mOsm) y la solución hiper-osmolar fue de 300 mOsm. En el segundo grupo la osmolaridad de la solución del LCR artificial basal era claramente inferior al fisiológico (230 mOsm), y la solución del pulso (aunque de mayor osmolaridad que la del LCR basal seguía siendo ligeramente hipo-osmolar) fue de 245 mOsm. Las muestras de dializado a lo largo del experimento fueron recogidas cada 10 minutos y la cuantificación de los niveles de taurina se realizaron a posteriori mediante las técnicas cromatográficas nombradas con anterioridad.

❖ Resultados

En ambos casos, el incremento de la osmolaridad disminuyó la taurina extracelular, en un 70% de su nivel basal en el primer grupo (solución basal de 285 mOsm) y en un 80% en el segundo grupo (solución basal de 230 mOsm), lo que sugiere que la taurina también responde al aumento de osmolaridad, incluso cuando se trata de pequeños incrementos en torno a los niveles normales de osmolaridad.

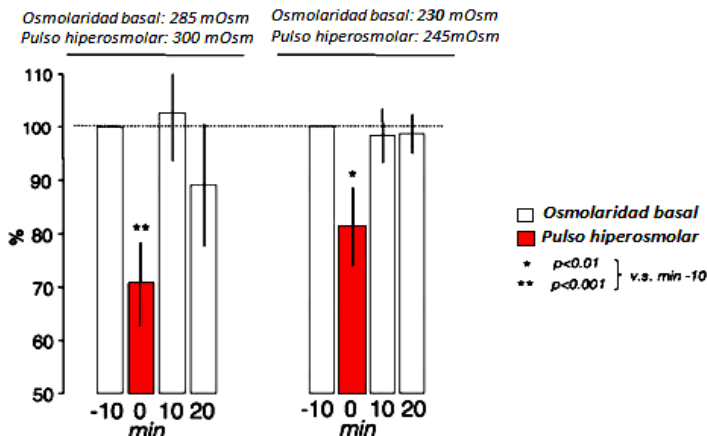


Figura 28. Disminución de la taurina extracelular de la sustancia negra después de haber aumentado la tonicidad por encima de la normal (285 mOsm en la izquierda) o por encima de una solución ligeramente hipotónica (230 mOsm en la derecha) respecto a la solución ringer basal. Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la administración del pulso hiper-osmolar (media \pm error estándar).

Experimento 13: Efecto de la hipo-osmolaridad en el reservorio de glutamato extracelular extrasináptico nigral.

❖ **Metodología**

En este experimento se utilizó un grupo de 6 ratas machos de 300 grs. Los animales fueron anestesiados con la técnica ya referida y la cánula de diálisis (2 mm de membrana de intercambio) fue introducida en la sustancia negra. Se perfundió durante 150 minutos de adaptación con LCR basal de 285 mOsm. A continuación se recogieron 30 minutos de dializado basal de 285 mOsm y, posteriormente, se administró un pulso hipo-osmolar de 130 mOsm durante 5 minutos. Durante todo el experimento se acumularon muestras de dializado durante periodos de 10 minutos, donde posteriormente se cuantificó el nivel extracelular de glutamato mediante las técnicas cromatográficas comentadas.

❖ **Resultados**

Se observó un aumento del 300% del glutamato extracelular extrasináptico durante la administración de pulsos hipo-osmóticos de 130 mOsm.

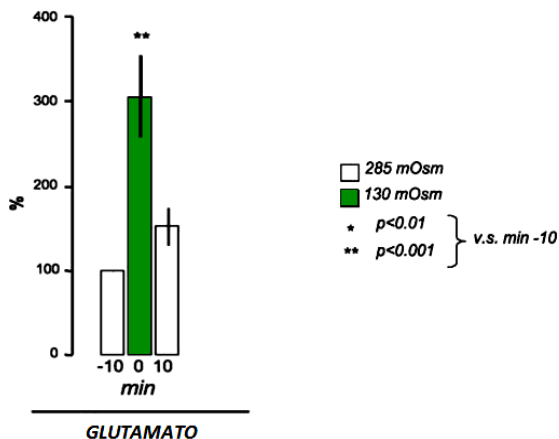


Figura 29. Liberación de glutamato durante la perfusión de un pulso hipo-osmolar (130 mOsm). Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la aplicación del pulso hipo-osmolar (media \pm error estándar).

Experimento 14: Efecto del bloqueo de los receptores AMPA-Kainato sobre la respuesta de la taurina a los pulsos de hipo-osmolaridad en la sustancia negra.

❖ Metodología

El objetivo de este experimento fue evaluar la posible acción mediadora del glutamato en la respuesta de la taurina a la hipo-osmolaridad. En este experimento se utilizaron 2 grupos de ratas machos de 300 grs., uno de 6 y otro de 9. Los animales fueron anestesiados y la cánula de diálisis (2 mm de membrana de intercambio) introducida en la sustancia negra. Al primer grupo se les perfundió una solución de LCR basal de 285 mOsm durante 150 minutos de adaptación, solución que en el segundo grupo incluía CNQX (bloqueante de los receptores AMPA-Kainato de glutamato). En ambos casos se procedió a administrar un pulso hipo-osmolar de 130 mOsm durante 5 minutos. Durante todo el experimento se acumularon muestras de dializado durante periodos de 10 minutos, para posteriormente cuantificar los niveles de taurina y glutamato mediante las técnicas cromatográficas comentadas.

❖ Resultados

El bloqueo de los receptores de AMPA-Kainato de glutamato con CNQX disminuyó la respuesta de la taurina a los pulsos hipo-osmolares (130 vs 285 mOsm), sugiriendo que la respuesta osmorreguladora de la taurina a la hipo-osmolaridad está mediada por la liberación de glutamato a través de los receptores ionotrópicos.

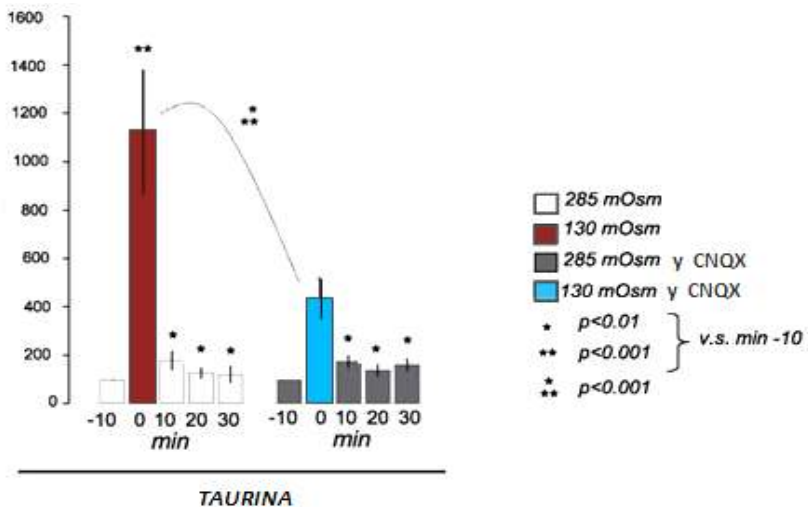


Figura 30. Liberación de taurina durante la administración de un pulso hipo-osmolar en condiciones basales (izquierda) y después de un tratamiento previo con 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-dionina disódico (500µM CNQX; derecha). Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la administración del pulso hipo-osmolar (media ± error estándar).

Experimento 15: La respuesta de la taurina a agonistas de los receptores purinérgicos P2.

❖ Metodología

El objetivo de este experimento fue evaluar la posible acción del ATP sobre los niveles extracelulares de taurina. Para este experimento se utilizaron 8 ratas, las cuales fueron perfundidas, mediante cánula de microdialísis, con una solución ringer basal iso-osmolar (285 mOsm) durante 150 minutos de adaptación. Seguidamente se les administró pulsos de ATP de 5 minutos a distintas concentraciones (0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 50 μM y 250 μM ; 90 minutos entre pulsos sucesivos) para estudiar el efecto de los receptores purinérgicos en la concentración de la taurina extracelular extrasináptica. Durante el experimento se recogieron muestras de dializado a intervalos de 10 minutos a los cuales se les midió los niveles de taurina mediante HPLC con detector fluorimétrico.

❖ Resultados

Se observó un incremento dosis dependiente de la taurina extracelular en respuesta a las soluciones de LCR artificial enriquecida con ATP, de forma que la amplitud de la respuesta de la taurina fue mayor cuando la concentración de ATP aumentó de 0,1 a 10 μM . Los estímulos de más de 10 μM de ATP (incremento de 350%) no produjeron mayores aumentos en el nivel de taurina, pero sí se observó que la duración de la respuesta persistió durante más tiempo cuando la concentración de ATP de los pulsos de estimulación se incrementaba (10 minutos para 1 μM de ATP, 20 minutos para 10 μM de ATP, más de 40 minutos en estímulos de 50 a 250 μM de ATP).

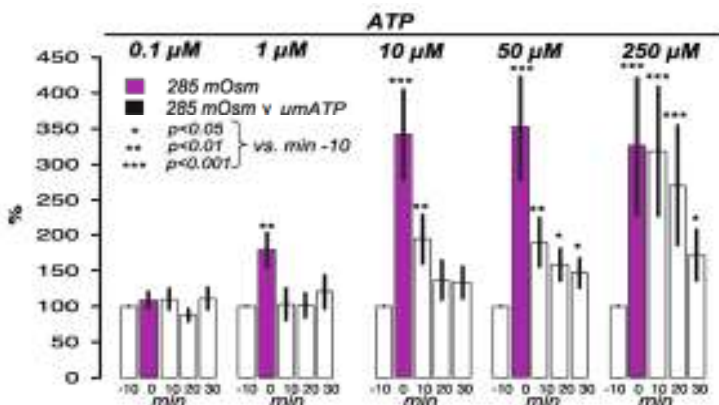


Fig.31 Respuesta de la taurina al incremento de ATP. Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la administración de ATP (media \pm error estándar).

Experimento 16: Participación de agonistas de los receptores purinérgicos P2 en la respuesta de la taurina nigral extracelular extrasináptico a los cambios locales de hipo-osmolaridad: acción de pulsos de ATP de corta larga.

❖ **Metodología**

El objetivo de este experimento fue analizar si la acción del ATP sobre los niveles extracelulares de taurina persistía tras la administración de pulsos prolongados de ATP. Para ello se utilizaron 5 ratas, las cuales fueron perfundidas con una solución ringer basal iso-osmolar (285 mOsm) durante 150 minutos de adaptación. Seguidamente se les administró un pulso sostenido de ATP (100 μ M). Durante el experimento se recogieron muestras de dializado a intervalos de 10 minutos donde posteriormente se cuantificaron los niveles de taurina por las técnicas cromatográficas descritas.

❖ **Resultados**

La perfusión sostenida de ATP indujo un aumento sostenido de taurina.

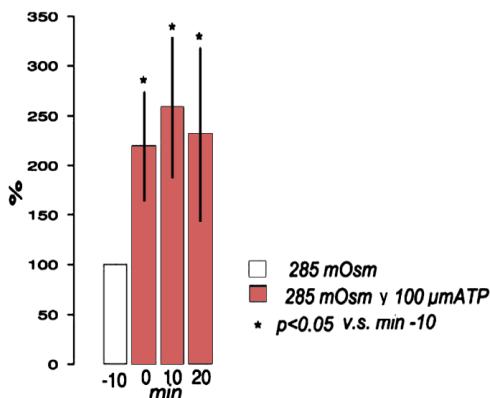


Figura 32. Liberación de taurina durante la perfusión continua de 100 μ M de ATP. Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la administración de ATP (media \pm error estándar).

Experimento 17: Respuesta taurinérgica a la hipo-osmolaridad en presencia de altas concentraciones de ATP en el medio extracelular.

❖ **Metodología**

El objetivo de este experimento fue evaluar si la respuesta de la taurina a la baja osmolaridad es dependiente de la presencia de ATP. Para este experimento se utilizaron dos grupos de 5 ratas. Los animales fueron

anestesiados y la cánula de diálisis (2 mm de membrana de intercambio) introducida en la sustancia negra. Al primer grupo se les perfundió una solución LCR basal de 285 mOsm durante 150 minutos de adaptación, solución que en el segundo grupo incluía ATP (100 μ M). En ambos caso se procedió a administrar un pulso hipo-osmolar de 180 mOsm durante 5 minutos. A lo largo de todo el experimento se acumularon muestras de dializado a intervalos de 10 minutos donde se analizó el nivel de taurina mediante las técnicas cromatográficas comentadas.

❖ Resultados

La respuesta de la taurina a la hipo-osmolaridad (180 mOsm) disminuye cuando los pulsos osmolares son producidos en presencia de altas concentraciones de ATP en el medio extracelular.

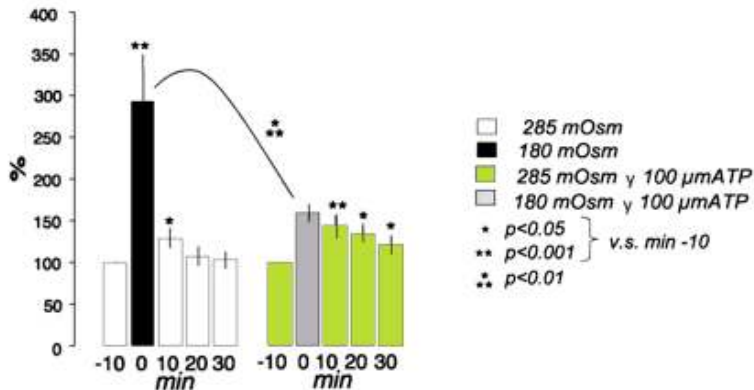


Figura 33. Liberación de taurina en la sustancia negra durante la administración de un pulso hipo-osmolar en condiciones basales (izquierda) y después de realizar un tratamiento previo con 100 μ M ATP (derecha). Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la administración de ATP o del pulso hipo-osmolar (media \pm error estándar).

Experimento 18: Efecto del antagonista de los receptores purinérgicos P2, piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato (PPADS), en la concentración extracelular de taurina en la sustancia negra.

❖ Metodología

Para evaluar la respuesta de la taurina al bloqueo de los receptores purinérgicos P2, se utilizaron 6 ratas machos de 300 gramos, que tras ser anestesiados se les introdujo una cánula de diálisis (2 mm de membrana de intercambio) en la sustancia negra. Fueron perfundidos durante 150 minutos con una solución ringer iso-osmolar (285 mOsm) para la adaptación del

sistema de microdiálisis, se recogieron 30 minutos de dializados basales de LCR de 285 mOsm, y se procedió a perfundir durante 40 minutos PPADS ($1\mu\text{M}$) en una solución ringer iso-osmolar. A lo largo del experimento se recogieron muestras de dializado cada 10 minutos para posteriormente cuantificar el nivel de taurina por las técnicas cromatográficas descritas.

❖ Resultados

El nivel de taurina extrasináptica presentó un incremento inicial tras la administración de PPADS en la solución de perfusión, una respuesta que cambió de signo de forma progresiva durante los 40 minutos siguientes. Estos resultados sugieren que, en condiciones basales de osmolaridad, los receptores purinérgicos facilitan la liberación de taurina.

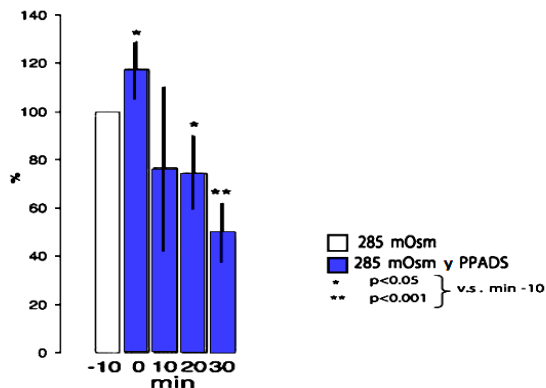


Figura 34 Liberación de taurina en la sustancia negra como respuesta a la administración continuada de 1 mM de ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico (PPADS). Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la administración de PPADS (media \pm error estándar).

Experimento 19: Efecto del antagonista de los receptores purinérgicos P2 piridoxal fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato (PPADS) en la respuesta de la taurina a la hipo-osmolaridad.

❖ Metodología

En este experimento se evaluó si la respuesta de la taurina a la baja osmolaridad está mediada por los receptores purinérgicos P2. Para este experimento se utilizaron dos grupos de 7 ratas que fueron anestesiadas con la técnica ya referida y a las que se les implantó la cánula de diálisis (2 mm de membrana de intercambio) en la sustancia negra. Seguidamente, los animales del primer grupo fueron perfundidos con una solución ringer basal iso-osmolar (285 mOsm) durante 150 minutos de adaptación, mientras que los del

segundo grupo incluía PPADS (1 μ M). En ambos caso se procedió a administrar pulsos hipo-osmolar de 130 mOsm durante 5 minutos. Durante todo el experimento se acumularon muestras de dializado a intervalos de 10 minutos, para la cuantificación de los niveles de taurina por las técnicas cromatográficas arriba comentadas.

❖ Resultados

El bloqueo de los receptores purinérgicos P2 con PPADS redujo la respuesta de la taurina a la hipo-osmolaridad (180 mOsm), lo que sugiere que la respuesta osmorreguladora de la taurina es facilitada por la activación de los receptores purinérgicos.

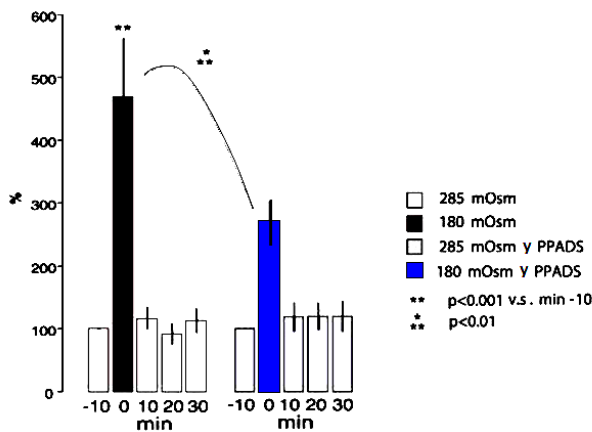


Figura 35. Liberación de taurina en la sustancia negra durante la administración de un pulso hipo-osmolar en condiciones basales (izquierda) y después de realizar un tratamiento previo con 1 mM PPADS (derecha). Los valores son porcentajes de los niveles basales tomados 10 minutos antes de la administración del pulso hipo-osmolar (media \pm error estándar).

Experimento 20: Efecto de la baja osmolaridad sobre reservorio extracelular no sináptico de glutamato.

❖ Metodología

Con anterioridad habíamos observado que la hipo-osmolaridad que incrementa los niveles extracelulares de taurina podría mediar su acción mediante la liberación de glutamato. En este experimento se evaluó de forma directa la acción de la osmolaridad sobre el glutamato extracelular. Se necesitaron 5 grupos de 7 ratas, las cuales fueron perfundidas a través de la cánula una solución ringer iso-osmolar (285 mOsm) de adaptación durante 150 minutos. Seguidamente, se perfundió en pulsos de 5 minutos, ringer de

distintas dosis de baja osmolaridad (270, 230, 180, 130 y 80 mOsm). Se recogieron viales postestímulos cada 10 minutos durante 30 minutos para la posterior determinación del glutamato por técnicas cromatográficas.

❖ **Resultados**

La disminución de la osmolaridad extracelular aumentó la concentración del glutamato de una manera dosis-dependiente (ANOVA de dosis de 270 mOsm: $F(3,52) = 1,91$, $p = 0,138$; dosis de 230 mOsm: $F(3,50) = 4,48$, $p < 0,01$; dosis 180 mOsm: $F(3,47) = 4,98$, $p < 0,01$, dosis 130 mOsm: $F(3,20) = 18,63$, $p < 0,001$; dosis de 80 mOsm: $F(3,17) = 12,95$, $p < 0,001$), induciendo un aumento de un 35% para un pulso de 270 mOsm y un aumento del 2.000% para 80mOsm. Este fue un efecto rápido y de corta duración que fue observado sólo durante el pulso de baja osmolaridad y que desapareció completamente 5 minutos después del cese del estímulo.

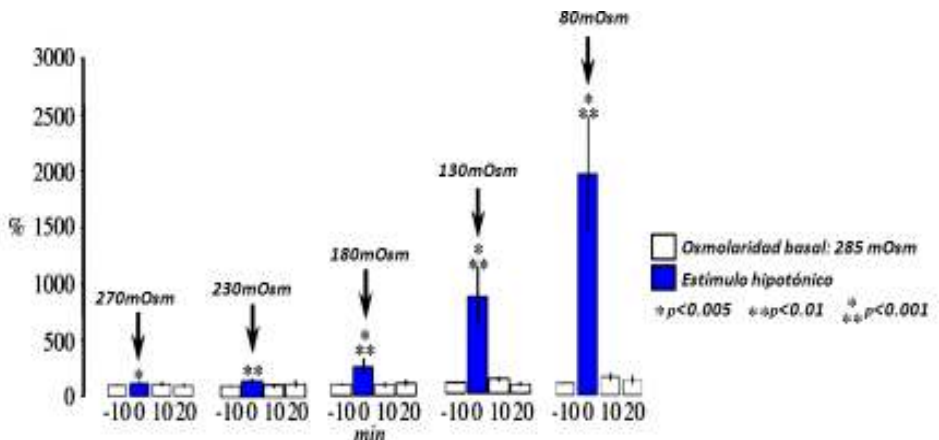


Figura 36. Liberación de glutamato en la sustancia negra bajo condiciones hipo-osmóticas. Aumento del glutamato extracelular no sináptico de forma dosis dependiente (285-80 mOsm) durante la perfusión de LCR hipo-osmótico. Los valores son porcentajes de los niveles basales recogidos durante los 10 minutos anteriores a la administración del pulso hipo-osmolar (media \pm error estándar).

Experimento 21: Efecto de los receptores purinérgicos P1 en la respuesta del glutamato nigral extracelular extrasináptico.

❖ **Metodología**

Para evaluar la acción de la estimulación de receptores purinérgicos P1 en la liberación de glutamato nigral, se implanto una cánula de diálisis en la sustancia negra de un grupo de 5 ratas y se esperó hasta que el sistema se estabilizara (150 min) con perfusión de LCR iso-osmolar (285 mOsm) a una

velocidad de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. A continuación, se administró una solución de adenosina en LCR iso-osmolar de forma pulsátil (1 mM durante 10 min), recogiendo el dializado cada 10 minutos durante los siguientes 50 minutos para el posterior análisis de la concentración de glutamato extracelular.

❖ Resultados

La adenosina no modificó la concentración del reservorio extracelular no sináptico de glutamato en la sustancia negra (ANOVA de dos factores, $F(6) = 1,99$, $p > 0.05$ para la variable: minutos después de la administración y $F(1) = 2,08$, $p > 0,05$).

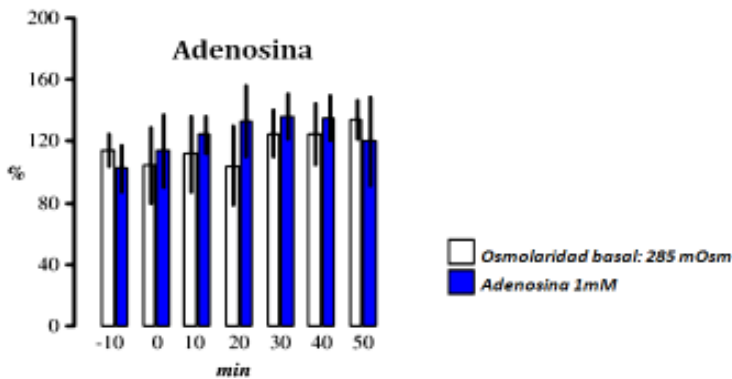


Figura 37. Respuesta del glutamato a la administración pulsátil de adenosina (1 mM durante 10 min). Los datos se muestran como porcentajes de los niveles basales calculados con los dos últimos dializados (-20 y -10 minutos) obtenidos antes de la administración del fármaco (media \pm error estándar).

Experimento 22: Efecto de los receptores purinérgicos P2 en la respuesta del glutamato nigral extracelular no sináptico.

❖ Metodología

En el estudio de la acción de la estimulación de los receptores purinérgicos P2 en la liberación de glutamato nigral, se utilizaron 3 grupos de 6 ratas que fueron perfundidas con una solución ringer iso-osmolar (285 mOsm; 2 $\mu\text{l}/\text{min}$) durante 150 minutos de adaptación. A continuación se administró a modo de pulsos de 5 minutos: 100 μM de 2'-metiltioadenosina trifosfato tetrasódico (2MeSATP; agonista sobre todo de los receptores P2X) en el grupo 2, 1 μM de adenosina-5'-trifosfato (ATP) en el grupo 3 se continuó con la perfusión de ringer en el grupo 1. Las soluciones de

2MeSATP y de ATP se realizaron en LCR iso-osmolar. Se recogieron muestras post estímulo cada 10 minutos durante 30 minutos.

❖ Resultados

Tanto el 2MeSATP (ANOVA, $F(4) = 3,18$, $p < 0,05$) como el ATP (ANOVA, $F(4) = 4,5$, $p < 0,01$) aumentaron la concentración de glutamato en el medio extracelular extrasináptico de la sustancia negra, un efecto que desapareció cinco minutos después de que las sustancias fueran retiradas.

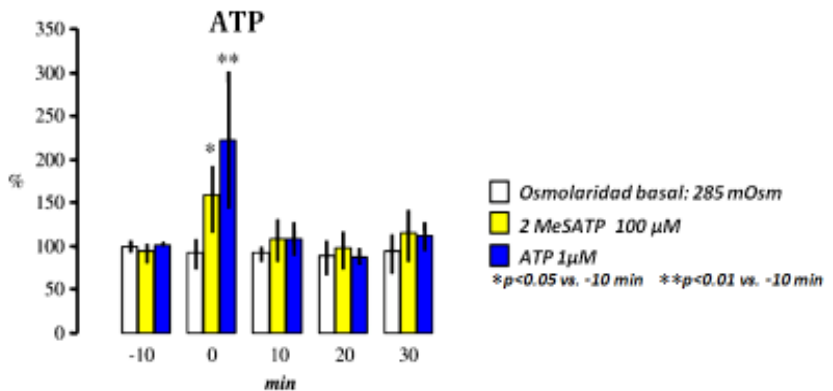


Figura 38. Respuesta del glutamato al ATP y a la administración 2MeSATP: curva tiempo-respuesta al ATP, al 2MeSATP y al LCR (pulsos de 5 min administrados a partir del minuto 0 al minuto 5). Los datos se muestran como porcentajes de los niveles basales calculados con las dos últimas dializaciones (-20 y -10 minutos) obtenidos antes de la administración del fármaco (media \pm error estándar).

Experimento 23: Efecto dosis creciente de agonista de la estimulación de receptores purinérgicos P2: adenosina-5'-trifosfato (ATP), en la respuesta del reservorio glutamatérgico nigral extracelular no sináptico a los cambios locales de osmolaridad.

❖ Metodología

El objetivo de este experimento fue evaluar la posible acción del ATP sobre los niveles extracelulares de glutamato. Para ello se utilizaron 5 grupos de 5 ratas que fueron perfundidas con una solución ringer basal iso-osmolar (285 mOsm) durante 150 minutos de adaptación. Seguidamente se les administró pulsos de ATP de 5 minutos a distintas concentraciones (0,1 μM, 1 μM, 10 μM, 50 μM y 100 μM) a cada grupo para estudiar el efecto de los receptores purinérgicos en la concentración del glutamato extracelular extrasináptica. Durante el experimento se recogieron muestras de dializado cada 10 minutos para posteriormente cuantificar los niveles

de glutamato por las técnicas cromatográficas comentadas con anterioridad.

❖ Resultados

El ATP indujo un aumento de glutamato extrasináptico dosis dependiente (ANOVA, $F(4) = 19.26$, $p < 0,001$).

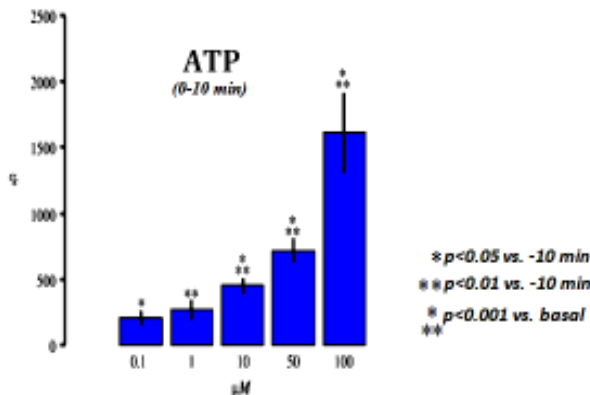


Figura 39. Curva dosis-respuesta de la acción del ATP en los niveles de glutamato extracelular extrasináptico de la sustancia negra (pulsos de 5 min administrado desde el minuto 0 al minuto 5). Los valores corresponden a las mediciones realizadas en dializados obtenidos 0-10 minutos después del comienzo del estímulo de ATP. Los datos se muestran como porcentajes de los niveles basales calculadas con las dos últimas dializados (-20 y -10 minutos) obtenidos antes de la administración del fármaco (media \pm SE).

Experimento 24: Efecto de los antagonistas de los receptores purinérgicos P2: piridoxalfosfato-6-azofenyl-2',4'-disulfónico (PPADS) en la respuesta del glutamato nigral extracelular extrasináptico a los cambios locales de hipo-osmolaridad.

❖ Metodología

La evaluación de la posible acción de los receptores purinérgicos P2 en la respuesta del glutamato extracelular a la hipo-osmolaridad, se realizó en dos grupos de 6 ratas cada uno, a los cuales se les administró un pulso hipo-osmolar de 180 mOsm por diálisis reversa durante 5 minutos. La solución ringer de la perfusión de uno de los grupos contenía PPADS 1 mM (antagonista no selectivo de los receptores P2) y la del otro no. Las muestras de dializado recogidas durante todo el experimento cada 10 minutos se utilizaron para la posterior cuantificación los niveles de glutamato por las técnicas cromatográficas ya comentadas.

❖ Resultados

El glutamato extracelular aumentó durante el pulso hipo-osmolar volviendo posteriormente a su nivel basal (ANOVA, $F(4) = 2,95$, $p < 0,05$). Esta respuesta no fue observada en el grupo perfundido con PPADS (ANOVA, $F(4) = 0,41$, $p > 0,05$). Estos resultados muestran que los receptores P2 participan en la respuesta del glutamato a la hipo-osmolaridad.

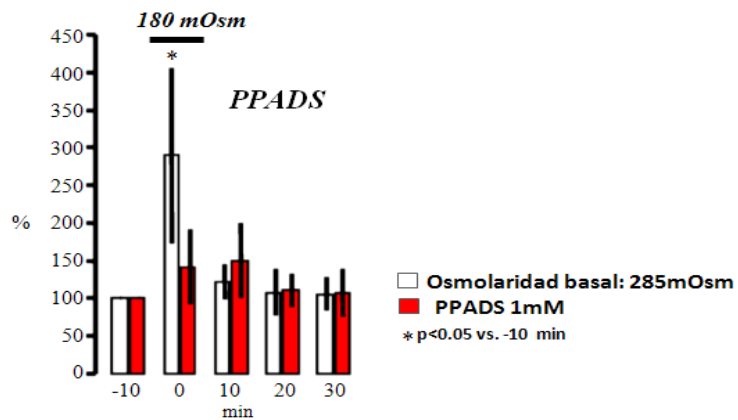


Figura 40. Los receptores P2 de nucleótidos y la respuesta del glutamato a la baja osmolaridad: efecto al bloquear los receptores P2 con PPADS. El tratamiento con PPADS se inició 60 minutos antes del pulso de hipo-osmolar (180 mOsm durante 5 min) y mantuvo durante todo el experimento. Los datos se muestran como porcentajes de los niveles basales obtenidos 10 minutos antes del pulso hipo-osmolar (media \pm error estándar).

Experimento 25: Acción de los receptores ionotrópicos AMPA/Kainato en la respuesta del glutamato nigral extracelular no sináptico

❖ Metodología

El estudio de la influencia de los receptores ionotrópicos AMPA/Kainato en la liberación nigral de glutamato en condiciones basales, fue llevada a cabo en 5 ratas a las que se les perfundió una solución ringer basal iso-osmolar (285 mOsm) durante 150 minutos de adaptación, seguido de la administración durante 40 minutos y mediante diálisis reversa de 500 μ M de 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-dionina disódico (CNQX; antagonista de los receptores ionotrópicos AMPA/Kainato). A lo largo del experimento se

recogieron muestras de dializado cada 10 minutos donde se midieron los niveles de glutamato por las técnicas cromatográficas comentadas con anterioridad.

❖ Resultados

El CNQX aumentó la concentración del glutamato nigral extracelular extrasináptico (ANOVA, $F(4) = 3,44$, $p < 0,05$), una respuesta que poco a poco se desvaneció durante los siguientes 20 minutos, a pesar de que la administración del antagonista persistió durante todo el estudio. Estos resultados muestran que los receptores AMPA/Kainato modulan la liberación basal de glutamato en la sustancia negra.

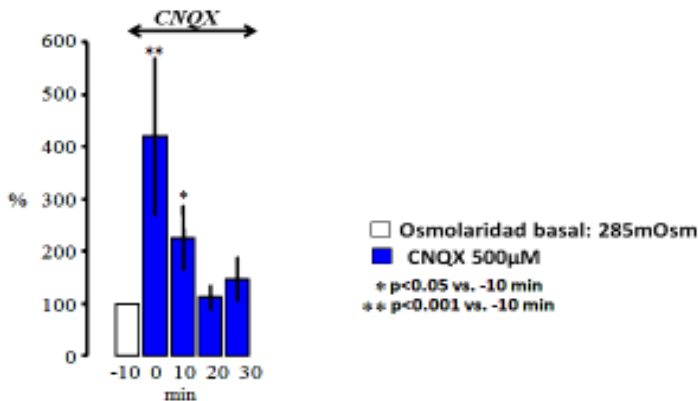


Figura 41. El efecto del bloqueo de los receptores ionotrópicos de glutamato con CNQX sobre el glutamato extracelular extrasináptico de la sustancia negra. Los datos se muestran como porcentajes de los niveles basales obtenidos 10 minutos antes de la administración CNQX (media \pm error estándar).

Experimento 26: Efecto de los receptores ionotrópicos (AMPA/kainato) en la respuesta del glutamato extracelular a los cambios locales de hipo-osmolaridad en la sustancia negra.

❖ Metodología

El objetivo de este experimento fue analizar el posible efecto de los receptores ionotrópicos AMPA/Kainato en la acción de la hipo-osmolaridad sobre los niveles extracelulares del glutamato nigral. Se utilizaron dos grupos de seis ratas cada uno a los que se les administró un pulso hipo-osmolar de 180 mOsm durante 5 minutos. La solución ringer de uno de los grupos contenía CNQX 1 mM, tanto en el ringer basal como en el pulso hipo-

osmolar. Se recogieron muestras de dializado cada 10 minutos a lo largo del experimento para posteriormente cuantificar los niveles de glutamato por las técnicas cromatográficas comentadas.

❖ Resultados

El glutamato extracelular aumentó durante el pulso hipo-osmolar en el grupo control (ANOVA, $F(4) = 3,70$, $p < 0,01$), y también en los animales a los que se les administró CNQX por diálisis reversa (ANOVA, $F(4) = 3,10$, $p < 0,05$). Estos resultados sugieren que los receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA/Kainato no están involucrados en la respuesta glutamatérgica a los cambios de osmolaridad.

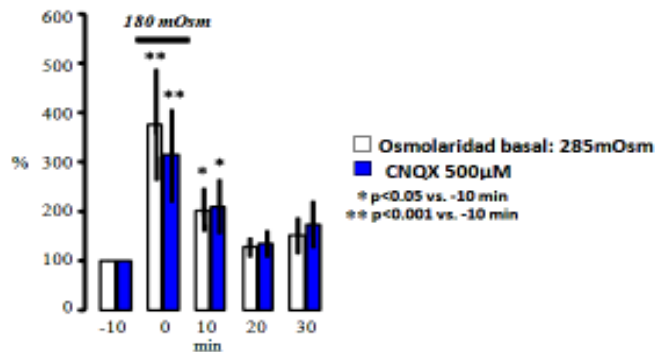


Figura 42. Respuesta del glutamato extracelular extrasináptico nigral a un pulso de baja osmolaridad (180 mOsm durante 10 min) previo tratamiento con CNQX (bloqueante de receptores ionotrópicos de glutamato) que comienza 60 minutos antes del pulso de hipo-osmolaridad y es mantenido durante todo el experimento. Los datos se muestran como porcentajes de los niveles basales obtenidos 10 minutos antes del pulso hipo-osmolar o la administración CNQX (media \pm error estándar).

Discusión experimentos 9-26.

Los presentes datos muestran una respuesta sensible y proporcional del reservorio extra-sináptico de taurina a la osmolaridad extracelular de la sustancia negra, y que es facilitada por la liberación de ATP y glutamato. Estos datos son la primera evidencia que sugiere un papel osmorregulador de la taurina en la sustancia negra en donde su única función conocida era la de neurotransmisor inhibitorio. Teniendo en cuenta que los mecanismos inflamatorios probablemente median en la degeneración nigral de las neuronas dopaminérgicas en la EP, la respuesta osmorreguladora de la taurina debería ser tomada como una nueva variable del ya complejo rompecabezas multifactorial con el que se trata de explicar el inicio y la evolución de esta enfermedad.

El principal hallazgo de este estudio fue el aumento dosis-dependiente de la taurina extrasináptica como consecuencia de la perfusión de soluciones hipo-osmolares. La respuesta de la taurina desapareció cuando la hipo-osmolaridad fue compensada con colina, lo cual demuestra que la respuesta no era debida a la baja concentración de iones en el ringer de perfusión. El efecto opuesto (disminución de la taurina) fue observado al aumentar la osmolaridad en las soluciones de perfusión. La acción osmorreguladora de la taurina probablemente está presente en condiciones fisiológicas (como sugieren las modificaciones observadas después de los cambios de osmolaridad de menos del 5%), pero también en condiciones patológicas (como sugieren las modificaciones observadas después de los cambios de osmolaridad entre el 20-70%). Estudios previos han sugerido que la taurina puede ser liberada en la sustancia negra desde neuronas estriónigrales (Bianchi et al. 1998, del Olmo et al. 2000). Esta taurina podría actuar sobre los receptores nigrales de glicina (Dopico et al. 2006, Hausser et al. 1992, Mangin 2002), modulando la conductancia del cloro (Yeager et al. 1996), la actividad electrofisiológica de las neuronas de la sustancia negra (Dray et al. 1976), y el comportamiento motor (Pycock et al. 1980). Además del reservorio neurotransmisor, nuestro laboratorio ha publicado la existencia de un reservorio de taurina no sináptica en la sustancia negra que cambia al modificar el metabolismo de las células gliales con fluorocitrato y con L-metionina sulfoximina (García Dopico et al. 2004). Los datos presentados aquí sugieren como función de este reservorio de taurina extra-sináptica la osmorregulación de las células nigrales (Timmerman et al. 1997, Herrera-Marschitz et al. 1996, Del Arco et al. 2003). Por lo tanto, la taurina puede tener dos funciones diferentes en la sustancia negra, la previamente publicada como neurotransmisor inhibitorio, y la de regulador osmótico extrasináptico sugerido aquí.

Aunque la taurina es uno de los osmolitos más estudiados, la identidad molecular de las vías de permeabilidad de la membrana utilizadas por la taurina para abandonar las células durante la respuesta osmótica es desconocida completamente. La taurina podría ser liberada al espacio extracelular extrasináptico por mecanismos no selectivos (ej. canales aniónicos activados por inflamación o hemicanales generados por uniones huecas) (Barakat et al. 2002, El Idrissi et al. 1999, Evanko et al. 2004, Kimelberg et al. 1990, Laird et al. 1996, Yeager et al. 1996) que explicaría el

hecho de que la liberación de taurina suele ir acompañada de la liberación de otros osmolitos (Schwartzkroin et al. 1998, Rothstein et al. 1996, Pasantes-Morales et al. 2002, Mongin et al. 2005, Franco et al. 2006). Este es el caso del glutamato y el ATP, dos sustancias que, con un peso molecular bajo y altas concentraciones citosólicas, pueden atravesar la membrana celular por algunas de las vías propuestas para la salida de la taurina (Laird et al. 1996, Yeager et al. 1996). El descubrimiento de una liberación colateral de glutamato (y presumiblemente de ATP), que acompaña a la liberación osmosensitiva de taurina en la sustancia negra sugiere que, de forma similar a lo descrito para otras células, la respuesta de la taurina a la osmolaridad implica vías no selectivas de membrana también en la sustancia negra.

La respuesta de la taurina disminuyó después de administrar PPADS y bajo la acción de concentraciones saturantes de ATP, y aumentó después de la administración de ATP, sugiriendo que una fracción de la respuesta osmorregulatoria de la taurina se activó por la estimulación osmótica de la liberación de ATP. Estudios previos han descrito una liberación osmosensitiva del ATP para otras células en dos pasos, una liberación inicial asociada directamente con la hipo-osmolaridad, quizás a través de los canales de aniones activados por inflamación (Hermoso et al. 2002, Hendil et al. 1974, Bond et al. 1998) seguida por un aumento y prolongación de la liberación de ATP causada por la activación autocrina de receptores purinérgicos (Chen et al. 1999, Mitchell et al. 1998, Rothstein et al. 1996, Schwiebert et al. 1995) que pueden formar grandes canales de membrana (North et al. 2000) permeables a moléculas de hasta 900 Da que facilitarían también la difusión de la taurina hacia el medio extracelular (Basarsky et al. 1999, Pasantes-Morales et al. 1984). Además, la estimulación de los receptores purinérgicos puede abrir también canales de aniones activados por inflamación (Darby et al. 2003) que podrían ser un mecanismo adicional de acción del ATP sobre la liberación de taurina (Basarsky et al. 1999, Pasantes-Morales et al. 1984).

La respuesta autosostenida de la liberación de ATP por retroalimentación podría estar en la base de la liberación persistente de taurina observada tanto tras la administración de las dosis más altas de ATP (que no indujeron a un aumento adicional de la taurina extracelular sino que prolongaron su duración) como después de la administración de soluciones hipo-osmolares bajo condiciones de saturación de los receptores de ATP (tras altas dosis de ATP). Así, los datos presentados sugieren que parte de la

respuesta osmorregulatoria de la taurina nigral tiene su acción a través de receptores purinérgicos. La disminución de la taurina basal observada tras la administración de PPADS sugiere que la modulación del ATP en la liberación de taurina está activa en condiciones basales (y no sólo bajo condiciones hiposmóticas), y apunta a los receptores P2, altamente expresados en la sustancia negra (Kanjhan et al. 1999), como los receptores purinérgicos involucrados en esta acción del ATP.

Se observó una reducción de la respuesta osmorregulatoria de la taurina después del bloqueo de los receptores AMPA / kainato con CNQX. Además, la reducción de la respuesta osmorregulatoria de la taurina observada después del bloqueo de los receptores AMPA / kainato con CNQX, junto con la evidencia previa de un aumento en la liberación de taurina después de la administración de glutamato y de AMPA (García Dopico et al. 2004), sugieren que la liberación de glutamato inducida por hipo-osmolaridad facilita la liberación osmorregulatoria de la taurina.

Recientes evidencias muestran la inflamación como un factor crítico para la degeneración celular de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson (Hartmann et al. 2003, Teismann et al. 2004). Aunque el intercambio intra / extracelular de solutos de bajo peso molecular es la adaptación más común y eficiente a las alteraciones de osmolaridad vinculadas a la respuesta inflamatoria, el flujo masivo de ciertas moléculas al medio extracelular puede dañar a las células desde las que son liberadas estas sustancias (ej. la liberación de ATP puede causar carencia energética) y también a sus células vecinas (ej. la liberación de glutamato puede provocar excitotoxicidad). Esto podría ser especialmente peligroso para las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, neuronas que son particularmente vulnerables a los desequilibrios energéticos (Schapira et al. 1990, Cooper et al. 1991) y a la acción tóxica del glutamato (Obeso et al. 2000, Obrenovitch et al. 1997, Olanow et al. 1999). En este contexto, el reservorio de taurina extra-sináptica podría ser útil para la regulación de la osmolaridad de las células en la sustancia negra sin inducir los efectos colaterales de otros osmolitos.

Por su alta solubilidad en agua y baja lipofilia (lo que facilita la creación de gradientes de concentración a través de membranas celulares), por su capacidad para difundir de manera eficiente a través de los canales de membrana cuando sea necesario, y por la carencia de funciones metabólicas

esenciales (la mayor proporción de taurina se excreta sin metabolizar a través del riñón), podemos considerar a la taurina como un osmorregulador biológico ideal (Huxtable et al. 1992). La liberación de taurina está directamente modulada por la osmolaridad e indirectamente modulada por otros osmolitos como el ATP o el glutamato. Por ello, este aminoácido podría desempeñar una función clave para la supervivencia de las células dopaminérgicas en condiciones desfavorables tales como las desencadenadas por la respuesta inflamatoria observada en la sustancia negra de los pacientes parkinsonianos (Obeso et al. 2002, Obeso et al. 2000).

El glutamato induce una acción de corta duración (unos pocos milisegundos) en más del 80% de las sinapsis del cerebro (reservorio de glutamato neuronal sináptico). La glía también puede liberar glutamato (Araque et al. 2000, Bezzi et al. 1998, Bezzi et al. 2004, Overstreet 2005, Pasti et al. 1997), originando efectos retardados y persistentes en receptores glutamatérgicos extrasinápticos de un área extensa (Agnati et al. 1995a, Contreras et al. 2002, Zoli et al. 1998). Este reservorio de glutamato extrasinápticos ha sido estudiado en diferentes centros telencefálicos tales como la amígdala (Tucci et al., 1998), el hipocampo (Lowy et al. 1993) y el estriado (Keefe et al. 1993), donde actúan como transmisor de volumen (Del Arco et al. 2003) realizando distintas funciones fisiológicas (Keefe et al. 1993, Lowy et al. 1993, Saulskaya y Marsden 1995, Shinohara et al. 2000, Tucci et al. 1998). Los datos obtenidos en esta memoria sugieren que el glutamato podría estar también involucrado en la regulación de la osmolaridad (Evanko et al. 2004, Franco et al. 2001, Pasantes- Morales et al. 2002, Schwartzkroin et al. 1998), lo cual explicaría la existencia del reservorio de glutamato extracelular extrasináptico de origen glial que previamente habíamos descrito en la sustancia negra (Rodríguez et al. 1998).

Estudios previos han referido un incremento del glutamato extracelular en células incubadas en condiciones de baja osmolaridad (Pasantes-Morales et al. 2002, Schwartzkroin et al. 1998, Franco et al. 2001). El mecanismo para la liberación osmosensitiva de glutamato no es bien conocido, pero partiendo de la alta concentración citosólica del glutamato (mM en el citosol vs μ molar en el espacio extracelular) (Tanaka et al. 1997, Nedergaard et al. 2002), la apertura osmorreguladora de las vías no selectivas de membrana y la liberación en conjunto de ATP y glutamato previamente comentada (Wieraszko et al. 1989), es posible que la respuesta del glutamato a los cambios de osmolaridad sea un proceso en dos etapas. El primer paso se

llevaría a cabo por las mismas vías no específicas de membrana utilizadas para la respuesta del ATP y el segundo paso estaría asociado a la retroalimentación acoplada a la liberación inicial del ATP (Duan et al. 2003, Fellin et al. 2006, Franke et al. 2006, Rodrigues et al. 2005). Los transportadores gliales son muy eficientes en la prevención de la difusión del glutamato por el medio extracelular (O'Connor et al. 1993, Obrenovitch et al. 1994).

En los últimos experimentos de esta Memoria se observa una respuesta proporcional del reservorio de glutamato extracelular extrasináptico a los cambios en la osmolaridad extracelular de la sustancia negra, acción observada tanto en respuesta a modificaciones intensas de osmolaridad similares a las que ocurren durante la producción de daño cerebral (> 20% de cambio de osmolaridad), como en respuesta a cambios pequeños de osmolaridad similares a las que se producen en condiciones fisiológicas (oscilaciones osmolares \approx 5%). Las pequeñas modificaciones de osmolaridad extracelular desencadenaron un aumento de un 50% en el reservorio de glutamato extracelular extrasináptico, lo que sugiere que, en condiciones fisiológicas, la osmolaridad local es un eficaz regulador del reservorio extrasináptico de glutamato en la sustancia negra. Teniendo en cuenta la alta estabilidad de la concentración extracelular del glutamato (Nedergaard et al. 2002, North et al. 2000) observada en condiciones basales (Rodríguez Díaz et al. 2005, Schurr et al. 1987, Smith et al. 1990), los datos presentados sugieren que la liberación osmótica del glutamato prevalece sobre otras actividades glutamatérgicas cuando el glutamato es liberado durante el daño celular, lo cual parece un escenario apropiado para la acción excitotóxica de este aminoácido (MacLeod et al. 1999, del Olmo et al. 2000).

Los datos obtenidos proporcionan la primera evidencia “*in vivo*” de la acción del ATP en la respuesta del glutamato a la osmolaridad extracelular en la sustancia negra. Puesto que sólo una proporción del ATP perfundido por la cánula de microdiálisis llega al cerebro (probablemente no más del 20%), la respuesta del glutamato observada después de una dosis de concentración muy baja de ATP (0,1-1 mM vs 0,5-5 utilizado en los estudios “*in vitro*”), sugiere la existencia de una alta sensibilidad de los niveles de glutamato extracelular extrasináptico al ATP extracelular en la sustancia negra. La reducción de la respuesta del glutamato extracelular extrasináptico al cambio osmótico observado después del tratamiento con PPADS, junto con pruebas anteriores realizadas “*in vitro*”, apuntan hacia la idea de que la liberación del

ATP durante la inflamación (Duan et al. 2003, Fellin et al. 2006, Franke y Illes 2006, Franke et al. 2006; Rodrigues et al. 2005) es un paso intermedio de la respuesta osmótica del glutamato. El glutamato extracelular aumentó tras de la administración 2MeSATP (agonista receptores P2), pero no lo hizo después de la administración de adenosina (agonista receptores P1), sugiriendo que la respuesta del glutamato al ATP implica receptores de nucleótidos, pero no receptores de nucleósidos (que podrían haber sido activados después de la metabolización ectoenzimática del ATP a adenosina) (Aguilar et al. 2001, Asensio et al. 2006). Como ya se comentó, los receptores P2 (Basarsky et al. 1999, Pasantes-Morales y Cruz 1984) pueden formar grandes canales de membrana permeable para moléculas de hasta 900 Da (51) y que podría facilitar la salida del glutamato desde el citoplasma de las células gliales (glutamato > 1 mM) al espacio extracelular (rango submicromolar) (Choi et al. 1987). Sin embargo, la respuesta del glutamato extracelular extrasináptico a la osmolaridad podría implicar, además de la respuesta ligada a receptores P2, a otros mecanismos gliales tales como la apertura de canales aniónicos activados por inflamación (Darby et al. 2003) o la liberación de glutamato vesicular (Bezzi et al. 1998, Bezzi et al. 2004, Coco et al. 2003, Parpura et al. 1995, Burgoyne y Morgan 2003).

La inflamación es una condición peligrosa para la mayoría de las células y en particular para las neuronas. Es sabido que la adaptación más común y eficiente de adaptación osmótica a las modificaciones inducidas por los procesos inflamatorios es el intercambio intra-extracelular de solutos de bajo peso molecular a través de la membrana celular. Este intercambio desencadena un flujo rápido de agua y la correspondiente regulación del volumen celular. La liberación masiva de glutamato observada durante la regulación de la osmolaridad sugiere nuevas posibilidades para la excitotoxicidad glutamatérgica en la enfermedad de Parkinson. El aumento en la tasa de disparo de las neuronas glutamatérgicas que inervan la sustancia negra ha sido propuesto como fuente para la acción excitotóxica del glutamato. Sin embargo, el aumento de la tasa de disparo que se produce en respuesta a una degeneración previa de neuronas dopaminérgicas no podría explicar el inicio de la enfermedad. Tomados en conjunto, los estudios anteriores (Rodriguez et al. 1998) y los datos presentes que sugieren que el glutamato glial es una fuente potencial de excitotoxicidad glutamatérgica en la sustancia negra. En comparación con el reservorio vesicular de glutamato sináptico, el glutamato glial forma un reservorio más amplio y que puede ser

liberado masivamente al espacio extracelular extrasináptico evitando la barrera perisináptica de los transportadores de glutamato gliales que limitan el trasiego extracelular del glutamato sináptico. Además, el glutamato glial presenta una acción más prolongada y amplia que el glutamato sináptico, el cual está necesariamente restringido a la hendidura sináptica donde sólo actúa durante unos pocos milisegundos. En el contexto de la respuesta inflamatoria crónica observada en la sustancia negra de los pacientes parkinsonianos, estas circunstancias sugieren que los cambios osmorreguladores del glutamato extracelular extrasináptico son una fuente potencial para la excitotoxicidad que podría actuar incluso durante las primeras etapas de la enfermedad de Parkinson.

CONCLUSIONES.

BLOQUE 1

1. El aumento de la concentración del glutamato extracelular extrasináptico puede desencadenar en el estriado degeneración de neuronas estriatales, y degeneración selectiva de aferencias glutamatérgicas provenientes del tálamo sin afectación de aferencias dopaminérgicas provenientes de la sustancia negra. Junto con estas acciones neuronales, el glutamato extracelular puede inducir la degeneración de astrocitos estriatales.
2. En las regiones estriatales con degeneración neuronal, el exceso de glutamato induce microgliosis. En las regiones perilesionales el glutamato induce astrocitosis reactiva con aumento del diámetro celular y de la expresión de GFAP, y pérdida del dominio espacial de los astrocitos.
3. La astrocitosis reactiva inducida por el glutamato fue observada tanto en astrocitos fibrosos como en astrocitos protoplásmicos. En ambos casos se desencadena una acumulación masiva de glutamato intracitosólico de larga duración (mas de 6 semanas) asociada a la inhibición selectiva de la glutamina sintetasa.
4. Las acciones locales de los excesos de glutamato extrasináptico en el estriado se siguen de una degeneración celular a distancia de las neuronas glutamatérgicas del tálamo que proyectan al estriado (núcleos intralaminares), una acción que se acompaña de microgliosis y astrocitosis talámica.
5. El glutamato, la dopamina y el ácido ascórbico presentan una marcada interacción funcional en el espacio extrasináptico del estriado. El glutamato inhibe la recaptación de dopamina, incrementando sus niveles extrasinápticos. La dopamina inhibe la liberación de glutamato, un efecto facilitado por la liberación de ácido ascórbico (asociada a la recaptación de glutamato) y la subsiguiente reducción de la oxidación de la dopamina.
6. La interacción dopamina-glutamato-ácido ascórbico es diferente en el estriado y en la sustancia negra, persistiendo tras la degeneración parcial del sistema nigro-estriatal. Esta interacción puede ser modulada por la administración periférica de fármacos que, como la

levodopa, son de uso habitual en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

BLOQUE 2

7. La hipo-osmolaridad desencadena en la SN una liberación rápida y masiva (incremento de hasta un 3000% del nivel basal) de glutamato que es dosis dependiente. A pesar de que los receptores AMPA/kainato modulan la liberación basal de glutamato en la sustancia negra, estos receptores no participan en la liberación de glutamato inducida por cambios de la osmolaridad local.
8. Los niveles nigrales de glutamato extrasináptico están modulados en la sustancia negra por receptores purinérgicos. Estos receptores están involucrados en la respuesta glutamatérgica nigral a los cambios de osmolaridad.
9. Los cambios de osmolaridad asociados a inflamación desencadenan una liberación de taurina al espacio extracelular extrasináptico de la SN, liberación que sigue un patrón lineal directo dependiente de la amplitud del cambio osmolar. La respuesta taurinérgica a la osmolaridad local actúa también en condiciones fisiológicas, respondiendo a pequeños incrementos o reducciones de osmolaridad.
10. La respuesta taurinérgica nigral está mediada por los receptores glutamatérgicos ionotrópicos del tipo AMPA/kainato y por receptores purinérgicos del tipo P2.

GENERAL

11. El estudio selectivo de la interacción de moduladores extracelulares extrasinápticos como el glutamato, la dopamina y el ácido ascórbico pueden ofrecer nuevas perspectivas para la comprensión de los mecanismos básicos de funcionamiento de los ganglios basales. En esta interacción participan neuronas y células gliales, poblaciones celulares implicadas en la enfermedad de Parkinson. El estudio de la interacción glutamato-dopamina-ácido ascórbico en el medio extrasináptico regulado por astrocitos podría apuntar algunas nuevas perspectivas a la progresión de la enfermedad, y a la afectación de neuronas no dopaminérgicas que fuera del estriado (tálamo) normalmente degeneran en esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, N., C. B. Lucking, S. Ricard, A. Durr, V. Bonifati, G. De Michele, S. Bouley, J. R. Vaughan, T. Gasser, R. Marconi, E. Broussolle, C. Brefel-Courbon, B. S. Harhangi, B. A. Oostra, E. Fabrizio, G. A. Bohme, L. Pradier, N. W. Wood, A. Filla, G. Meco, P. Deneffe, Y. Agid & A. Brice (1999) A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet*, 8, 567-74.
- Abercrombie, E. D., A. E. Bonatz & M. J. Zigmond (1990) Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats. *Brain Res*, 525, 36-44.
- Afonso, D., M. A. Castellanos & M. Rodriguez (1990) Determination of monoamines and indoles in amniotic fluid by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection. *J Chromatogr*, 528, 101-9.
- Afonso-Oramas, D., I. Cruz-Muros, D. Alvarez de la Rosa, P. Abreu, T. Giraldez, J. Castro-Hernandez, J. Salas-Hernandez, J. L. Lanciego, M. Rodriguez & T. Gonzalez-Hernandez (2009) Dopamine transporter glycosylation correlates with the vulnerability of midbrain dopaminergic cells in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 36, 494-508.
- Agnati, L. F., B. Bjelke & K. Fuxe (1995a) Volume versus wiring transmission in the brain: a new theoretical frame for neuropsychopharmacology. *Med Res Rev*, 15, 33-45.
- Agnati, L. F., M. Zoli, I. Stromberg & K. Fuxe. 1995b. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. In *Neuroscience*, 711-26. United States.
- Aguilar, J. S., R. Reyes, A. C. Asensio, S. Oaknin, P. Rotllan & R. Miledi. 2001. Ecto enzymatic breakdown of diadenosine polyphosphates by *Xenopus laevis* oocytes. In *Eur J Biochem*, 1289-97. Germany.
- Airaksinen, M. S., H. Thoenen & M. Meyer (1997) Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin-D28k-deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and weaver mice. *Eur J Neurosci*, 9, 120-7.
- Aizenman, E., K. A. Hartnett & I. J. Reynolds (1990) Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. *Neuron*, 5, 841-6.
- Albin, R. L., A. B. Young & J. B. Penney (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12, 366-75.
- Albrecht, J., U. Sonnwald, H. S. Waagepetersen & A. Schousboe (2007)

- Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci*, 12, 332-43.
- Alexander, G. E., M. R. DeLong & P. L. Strick (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*, 9, 357-81.
- Alheid, G. F., L. Heimer & R. C. Switzer. 1990. Basal ganglia. The human nervous system., 483-582. San Diego: G. Paxinos ed. Academic Press.
- Allen, I. C., A. Grieve & R. Griffiths (1986) Differential changes in the content of amino acid neurotransmitters in discrete regions of the rat brain prior to the onset and during the course of homocysteine-induced seizures. *J Neurochem*, 46, 1582-92.
- Alonso-Frech, F., J. J. Sanahuja & A. M. Rodriguez (2011) Exercise and physical therapy in early management of Parkinson disease. *Neurologist*, 17, S47-53.
- Alvarez, L., R. Macias, J. Guridi, G. Lopez, E. Alvarez, C. Maragoto, J. Teijeiro, A. Torres, N. Pavon, M. C. Rodriguez-Oroz, L. Ochoa, H. Hetherington, J. Juncos, M. R. DeLong & J. A. Obeso (2001) Dorsal subthalamotomy for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 16, 72-8.
- Alvarez, L., R. Macias, N. Pavon, G. Lopez, M. C. Rodriguez-Oroz, R. Rodriguez, M. Alvarez, I. Pedroso, J. Teijeiro, R. Fernandez, E. Casabona, S. Salazar, C. Maragoto, M. Carballo, I. Garcia, J. Guridi, J. L. Juncos, M. R. DeLong & J. A. Obeso (2009) Therapeutic efficacy of unilateral subthalamotomy in Parkinson's disease: results in 89 patients followed for up to 36 months. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80, 979-85.
- Ambani, L. M., M. H. Van Woert & S. Murphy (1975) Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol*, 32, 114-8.
- Andersen, J. K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*, 10 Suppl, S18-25.
- Anderson, C. M. & R. A. Swanson (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32, 1-14.
- Andlin-Sobocki, P., B. Jonsson, H. U. Wittchen & J. Olesen. 2005. Cost of disorders of the brain in Europe. In *Eur J Neurol*, 1-27. England.
- Andre, V. M., C. Cepeda & M. S. Levine (2010) Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci Ther*, 16, 163-78.
- Ao, X., T. J. Sellati & J. A. Stenken (2004) Enhanced microdialysis relative recovery of inflammatory cytokines using antibody-coated microspheres analyzed by flow cytometry. *Anal Chem*, 76, 3777-84.
- Araneda, R. & G. Bustos (1989) Modulation of dendritic release of dopamine by N-methyl-D-aspartate receptors in rat substantia nigra. *J*

- Neurochem*, 52, 962-70.
- Araque, A., N. Li, R. T. Doyle & P. G. Haydon (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*, 20, 666-73.
- Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri & P. G. Haydon. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. In *Trends Neurosci*, 208-15. England.
- Arbilla, S. & S. Z. Langer (1981) Stereoselectivity of presynaptic autoreceptors modulating dopamine release. *Eur J Pharmacol*, 76, 345-51.
- Ascherio, A., S. M. Zhang, M. A. Hernan, I. Kawachi, G. A. Colditz, F. E. Speizer & W. C. Willett (2001) Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol*, 50, 56-63.
- Atlante, A., P. Calissano, A. Bobba, S. Giannattasio, E. Marra & S. Passarella (2001) Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett*, 497, 1-5.
- Asensio, A. C., C. R. Rodriguez-Ferrer, A. Castaneyra-Perdomo, S. Oaknin & P. Rotllan. 2007. Biochemical analysis of ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase activity in brain membranes indicates involvement of NPP1 isoenzyme in extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates in central nervous system. In *Neurochem Int*, 581-90. England.
- Aymerich, M. S., P. Barroso-Chinea, M. Perez-Manso, A. M. Munoz-Patino, M. Moreno-Igoa, T. Gonzalez-Hernandez & J. L. Lanciego (2006) Consequences of unilateral nigrostriatal denervation on the thalamostriatal pathway in rats. *Eur J Neurosci*, 23, 2099-108.
- Backlund, E. O., P. O. Granberg, B. Hamberger, E. Knutsson, A. Martensson, G. Sedvall, A. Seiger & L. Olson (1985) Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg*, 62, 169-73.
- Baker, D. A., Z. X. Xi, H. Shen, C. J. Swanson & P. W. Kalivas (2002) The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci*, 22, 9134-41.
- Baker, J. T., J. P. Donoghue & J. N. Sanes (1999) Gaze direction modulates finger movement activation patterns in human cerebral cortex. *J Neurosci*, 19, 10044-52.
- Bakiri, Y., V. Burzomato, G. Frugier, N. B. Hamilton, R. Karadottir & D. Attwell (2009) Glutamatergic signaling in the brain's white matter. *Neuroscience*, 158, 266-74.
- Ball, E. F., P. J. Shaw, P. G. Ince & M. Johnson (1994) The distribution of excitatory amino acid receptors in the normal human midbrain and basal ganglia with implications for Parkinson's disease: a quantitative

- autoradiographic study using [3H]MK-801, [3H]glycine, [3H]CNQX and [3H]kainate. *Brain Res*, 658, 209-18.
- Banati, R. B., S. E. Daniel & S. B. Blunt (1998) Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov Disord*, 13, 221-7.
- Barakat, L., D. Wang & A. Bordey. 2002. Carrier-mediated uptake and release of taurine from Bergmann glia in rat cerebellar slices. In *J Physiol*, 753-67. England.
- Barbanoj, M., V. M. Campos Arillo, S. Gimenez-Roldan, J. Kulisevsky, G. Linazasoro Cristobalampos, M. R. Luquin Piudo & L. Vela Desojo (2001) [Dopamine agonists situation in Parkinson disease]. *Rev Neurol*, 33, 1071-93.
- Barbour, B. & M. Haussler. 1997. Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. In *Trends Neurosci*, 377-84. England.
- Barcia, C., A. Sanchez Bahillo, E. Fernandez-Villalba, V. Bautista, Y. P. M. Poza, A. Fernandez-Barreiro, E. C. Hirsch & M. T. Herrero (2004) Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia*, 46, 402-9.
- Bartus, R. T., L. Brown, A. Wilson, B. Kruegel, J. Siffert, E. M. Johnson, Jr., J. H. Kordower & C. D. Herzog (2011) Properly scaled and targeted AAV2-NRTN (neurturin) to the substantia nigra is safe, effective and causes no weight loss: support for nigral targeting in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 44, 38-52.
- Barzilai, A., E. Melamed & A. Shirvan (2001) Is there a rationale for neuroprotection against dopamine toxicity in Parkinson's disease? *Cell Mol Neurobiol*, 21, 215-35.
- Basarsky, T. A., D. Feighan & B. A. MacVicar (1999) Glutamate release through volume-activated channels during spreading depression. *J Neurosci*, 19, 6439-45.
- Basse-Tomusk, A. & G. V. Rebec (1991) Regional distribution of ascorbate and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in rat striatum. *Brain Res*, 538, 29-35.
- Bata-Garcia, J. L., L. Tun-Coba, F. J. Alvarez-Cervera, J. R. Villanueva-Toledo, F. J. Heredia-Lopez & J. L. Gongora-Alfaro (2010) Improvement of postural adjustment steps in hemiparkinsonian rats chronically treated with caffeine is mediated by concurrent blockade of A1 and A2A adenosine receptors. *Neuroscience*, 166, 590-603.
- Beal, M. F. (1998) Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol*, 44, S110-4.
- Beal, M. F., R. C. Frank, D. W. Ellison & J. B. Martin (1986) The effect of neuropeptide Y on striatal catecholamines. *Neurosci Lett*, 71, 118-23.
- Beckstead, M. J., D. K. Grandy, K. Wickman & J. T. Williams (2004) Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current

- in midbrain dopamine neurons. *Neuron*, 42, 939-46.
- Beckstead, R. M. & A. Frankfurter (1982) The distribution and some morphological features of substantia nigra neurons that project to the thalamus, superior colliculus and pedunculopontine nucleus in the monkey. *Neuroscience*, 7, 2377-88.
- Behrstock, S., A. Ebert, J. McHugh, S. Vosberg, J. Moore, B. Schneider, E. Capowski, D. Hei, J. Kordower, P. Aebischer & C. N. Svendsen (2006) Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates. *Gene Ther*, 13, 379-88.
- Ben, R., F. Ji-Chang, B. Yao-Dong, L. Yie-Jian & Z. Yi-Fang (1991) Transplantation of cultured fetal adrenal medullary tissue into the brain of Parkinsonian. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 52, 42-4.
- Ben-Shachar, D., G. Eshel, P. Riederer & M. B. Youdim (1992) Role of iron and iron chelation in dopaminergic-induced neurodegeneration: implication for Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 32 Suppl, S105-10.
- Beninato, M. & R. F. Spencer (1987) A cholinergic projection to the rat substantia nigra from the pedunculopontine tegmental nucleus. *Brain Res*, 412, 169-74.
- Benveniste, H. & P. C. Huttemeier (1990) Microdialysis--theory and application. *Prog Neurobiol*, 35, 195-215.
- Berendse, H. W. & H. J. Groenewegen (1990) Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J Comp Neurol*, 299, 187-228.
- Bergman, H., T. Wichmann, B. Karmon & M. R. DeLong (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol*, 72, 507-20.
- Bergman, H., A. Feingold, A. Nini, A. Raz, H. Slovin, M. Abeles & E. Vaadia (1998) Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci*, 21, 32-8.
- Berman, S. B. & T. G. Hastings (1999) Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*, 73, 1127-37.
- Berman, S. B., M. J. Zigmond & T. G. Hastings (1996) Modification of dopamine transporter function: effect of reactive oxygen species and dopamine. *J Neurochem*, 67, 593-600.
- Bernard, V. & J. P. Bolam (1998) Subcellular and subsynaptic distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor in the neostriatum and globus pallidus of the rat: co-localization at synapses with the GluR2/3 subunit of the AMPA receptor. *Eur J Neurosci*, 10, 3721-36.
- Bernardo, A., G. Levi & L. Minghetti (2000) Role of the peroxisome

- proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and its natural ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions. *Eur J Neurosci*, 12, 2215-23.
- Berridge, C. W. & T. A. Stalnaker (2002) Relationship between low-dose amphetamine-induced arousal and extracellular norepinephrine and dopamine levels within prefrontal cortex. *Synapse*, 46, 140-9.
- Berry, C., C. La Vecchia & P. Nicotera (2010) Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ*, 17, 1115-25.
- Betarbet, R., T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov & J. T. Greenamyre (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3, 1301-6.
- Bezard, E., C. E. Gross, M. C. Fournier, S. Dovero, B. Bloch & M. Jaber (1999) Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol*, 155, 268-73.
- Bezard, E., T. Boraud, B. Bioulac & C. E. Gross (1999a) Involvement of the subthalamic nucleus in glutamatergic compensatory mechanisms. *Eur J Neurosci*, 11, 2167-70.
- Bezard, E., C. E. Gross, M. C. Fournier, S. Dovero, B. Bloch & M. Jaber (1999b) Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol*, 155, 268-73.
- Bezzi, P., G. Carmignoto, L. Pasti, S. Vesce, D. Rossi, B. L. Rizzini, T. Pozzan & A. Volterra (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, 391, 281-5.
- Bezzi, P., V. Gundersen, J. L. Galbete, G. Seifert, C. Steinhauser, E. Pilati & A. Volterra. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. In *Nat Neurosci*, 613-20. United States.
- Bianchi, L., M. A. Colivicchi, J. P. Bolam & L. Della Corte. 1998. The release of amino acids from rat neostriatum and substantia nigra in vivo: a dual microdialysis probe analysis. In *Neuroscience*, 171-80. United States.
- Bickford, M. E. & W. C. Hall (1992) The nigral projection to predorsal bundle cells in the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol*, 319, 11-33.
- Bindoff, L. A., M. Birch-Machin, N. E. Cartlidge, W. D. Parker, Jr. & D. M. Turnbull. 1989. Mitochondrial function in Parkinson's disease. In *Lancet*, 49. England.
- Blandini, F., G. Nappi, C. Tassorelli & E. Martignoni (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 62, 63-88.
- Blum, D., S. Torch, N. Lambeng, M. Nissou, A. L. Benabid, R. Sadoul & J. M. Verna (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory

- in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 65, 135-72.
- Bobillier, P., S. Seguin, F. Petitjean, D. Salvvert, M. Touret & M. Jouvret (1976) The raphe nuclei of the cat brain stem: a topographical atlas of their efferent projections as revealed by autoradiography. *Brain Res*, 113, 449-86.
- Boka, G., P. Anglade, D. Wallach, F. Javoy-Agid, Y. Agid & E. C. Hirsch (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 172, 151-4.
- Bolam, J. P. & P. N. Izzo (1988) The postsynaptic targets of substance P-immunoreactive terminals in the rat neostriatum with particular reference to identified spiny striatonigral neurons. *Exp Brain Res*, 70, 361-77.
- Bolam, J. P. & Y. Smith (1990) The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res*, 529, 57-78.
- Bond, T. D., S. Ambikapathy, S. Mohammad & M. A. Valverde (1998) Osmosensitive Cl⁻ currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *J Physiol*, 511 (Pt 1), 45-54.
- Bonifati, V., P. Rizzu, M. J. van Baren, O. Schaap, G. J. Breedveld, E. Krieger, M. C. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. Joesse, J. W. van Dongen, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C. M. van Duijn, B. A. Oostra & P. Heutink (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299, 256-9.
- Borland, L. M. & A. C. Michael (2004) Voltammetric study of the control of striatal dopamine release by glutamate. *J Neurochem*, 91, 220-9.
- Bosboom, J. L., D. Stoffers & E. Wolters (2004) Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 111, 1303-15.
- Bove, J., D. Prou, C. Perier & S. Przedborski (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*, 2, 484-94.
- Braak, H., K. Del Tredici, U. Rub, R. A. de Vos, E. N. Jansen Steur & E. Braak (2003a) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24, 197-211.
- Braak, H., U. Rub, W. P. Gai & K. Del Tredici (2003b) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm*, 110, 517-36.
- Bracci, E., D. Centonze, G. Bernardi & P. Calabresi (2002) Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J Neurophysiol*, 87, 2190-4.
- Brannan, T., A. Prikhojan & M. D. Yahr (1997) Peripheral and central inhibitors of catechol-O-methyl transferase: effects on liver and brain COMT activity and L-DOPA metabolism. *J Neural Transm*, 104, 77-

- Breit, S., R. Bouali-Benazzouz, A. L. Benabid & A. Benazzouz (2001) Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway induces an increase of neuronal activity of the pedunculopontine nucleus, which is reversed by the lesion of the subthalamic nucleus in the rat. *Eur J Neurosci*, 14, 1833-42.
- Brito-Armas JM, Castro-Hernandez J, Rodriguez-Diaz M, Castro-Fuentes R (2011) Terapia genica no invasiva en enfermedades neurologicas. *Rev Neurol* 52: 603-17.
- Bruton, R. K., J. Ge & N. M. Barnes (1999) Group I mGlu receptor modulation of dopamine release in the rat striatum in vivo. *Eur J Pharmacol*, 369, 175-81.
- Burgoyne, R. D. & A. Morgan (2003) Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev*, 83, 581-632.
- Burke, W. J., S. W. Li, H. D. Chung, D. A. Ruggiero, B. S. Kristal, E. M. Johnson, P. Lampe, V. B. Kumar, M. Franko, E. A. Williams & D. S. Zahm (2004) Neurotoxicity of MAO metabolites of catecholamine neurotransmitters: role in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology*, 25, 101-15.
- Burke, W. J., S. W. Li, E. A. Williams, R. Nonneman & D. S. Zahm (2003) 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde is the toxic dopamine metabolite in vivo: implications for Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Res*, 989, 205-13.
- Burnashev, N., H. Monyer, P. H. Seeburg & B. Sakmann (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron*, 8, 189-98.
- Bush, T. G., N. Puvanachandra, C. H. Horner, A. Polito, T. Ostenfeld, C. N. Svendsen, L. Mucke, M. H. Johnson & M. V. Sofroniew (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23, 297-308.
- Calabresi, P., N. B. Mercuri & G. Bernardi (1993) Chemical modulation of synaptic transmission in the striatum. *Prog Brain Res*, 99, 299-308.
- Calingasan, N. Y., W. J. Chun, L. C. Park, K. Uchida & G. E. Gibson (1999) Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 946-58.
- Calingasan, N. Y., L. C. Park, L. L. Calo, R. R. Trifiletti, S. E. Gandy & G. E. Gibson (1998) Induction of nitric oxide synthase and microglial responses precede selective cell death induced by chronic impairment of oxidative metabolism. *Am J Pathol*, 153, 599-610.
- Cammack, J., B. Ghasemzadeh & R. N. Adams (1991) The pharmacological profile of glutamate-evoked ascorbic acid efflux measured by in vivo

- electrochemistry. *Brain Res*, 565, 17-22.
- Cannon, J. R., V. Tapias, H. M. Na, A. S. Honick, R. E. Drolet & J. T. Greenamyre (2009) A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 34, 279-90.
- Cardin, V., R. Lezama, M. E. Torres-Marquez & H. Pasantes-Morales (2003) Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic Ca²⁺ rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia*, 44, 119-28.
- Carlsson, M. & A. Carlsson (1990) Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 13, 272-6.
- Carpenter, M. B., K. Nakano & R. Kim (1976) Nigrothalamic projections in the monkey demonstrated by autoradiographic technics. *J Comp Neurol*, 165, 401-15.
- Carvalho, G. A. & G. Nikkhah (2001) Subthalamic nucleus lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-induced striatal lesions and restore postural balancing reactions. *Exp Neurol*, 171, 405-17.
- Cass, W. A., G. A. Gerhardt, R. D. Mayfield, P. Curella & N. R. Zahniser (1992) Differences in dopamine clearance and diffusion in rat striatum and nucleus accumbens following systemic cocaine administration. *J Neurochem*, 59, 259-66.
- Castellano, M. A. & M. Rodriguez Diaz (1991) Nigrostriatal dopaminergic cell activity is under control by substantia nigra of the contralateral brain side: electrophysiological evidence. *Brain Res Bull*, 27, 213-8.
- Castle, M., M. S. Aymerich, C. Sanchez-Escobar, N. Gonzalo, J. A. Obeso & J. L. Lanciego (2005) Thalamic innervation of the direct and indirect basal ganglia pathways in the rat: Ipsi- and contralateral projections. *J Comp Neurol*, 483, 143-53.
- Caudle, W. M., J. R. Richardson, M. Z. Wang, T. N. Taylor, T. S. Guillot, A. L. McCormack, R. E. Colebrooke, D. A. Di Monte, P. C. Emson & G. W. Miller (2007) Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *J Neurosci*, 27, 8138-48.
- Cavelier, P. & D. Attwell (2005) Tonic release of glutamate by a DIDS-sensitive mechanism in rat hippocampal slices. *J Physiol*, 564, 397-410.
- Celsi, F., P. Pizzo, M. Brini, S. Leo, C. Fotino, P. Pinton & R. Rizzuto (2009) Mitochondria, calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 335-44.
- Cerruti, C., D. M. Walther, M. J. Kuhar & G. R. Uhl (1993) Dopamine transporter mRNA expression is intense in rat midbrain neurons and modest outside midbrain. *Brain Res Mol Brain Res*, 18, 181-6.
- Chan, C. S., T. S. Gertler & D. J. Surmeier (2009) Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 32,

249-56.

- Charara, A., Y. Smith & A. Parent (1996) Glutamatergic inputs from the pedunculopontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labeling combined with postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 364, 254-66.
- Chatha, B. T., V. Bernard, P. Streit & J. P. Bolam (2000) Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. *Neuroscience*, 101, 1037-51.
- Chen, Q., K. Moulder, T. Tenkova, K. Hardy, J. W. Olney & C. Romano. 1999. Excitotoxic cell death dependent on inhibitory receptor activation. In *Exp Neurol*, 215-25. United States.
- Chen, Q., L. Veenman, K. Knopp, Z. Yan, L. Medina, W. J. Song, D. J. Surmeier & A. Reiner (1998) Evidence for the preferential localization of glutamate receptor-1 subunits of AMPA receptors to the dendritic spines of medium spiny neurons in rat striatum. *Neuroscience*, 83, 749-61.
- Cheng, H. C., C. M. Ulane & R. E. Burke (2010) Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol*, 67, 715-25.
- Chicken, S., P. Shashidharan & A. Nambu (2008) Cortically evoked long-lasting inhibition of pallidal neurons in a transgenic mouse model of dystonia. *J Neurosci*, 28, 13967-77.
- Choi, D. W., M. Maulucci-Gedde & A. R. Kriegstein (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 7, 357-68.
- Choi, S. H., S. Y. Kim, J. J. An, S. H. Lee, D. W. Kim, M. H. Won, T. C. Kang, J. Park, W. S. Eum, J. Kim & S. Y. Choi (2006) Immunohistochemical studies of human ribosomal protein S3 (rpS3). *J Biochem Mol Biol*, 39, 208-15.
- Chojnacki, A. & S. Weiss (2008) Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells. *Nat Protoc*, 3, 935-40.
- Christine, C. W., P. A. Starr, P. S. Larson, J. L. Eberling, W. J. Jagust, R. A. Hawkins, H. F. VanBrocklin, J. F. Wright, K. S. Bankiewicz & M. J. Aminoff (2009) Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*, 73, 1662-9.
- Cicchetti, F., J. Drouin-Ouellet & R. E. Gross (2009) Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol Sci*, 30, 475-83.
- Cilia, R., C. Siri, G. Marotta, I. U. Isaias, D. De Gaspari, M. Canesi, G. Pezzoli & A. Antonini (2008) Functional abnormalities underlying pathological gambling in Parkinson disease. *Arch Neurol*, 65, 1604-11.

- Clarke, P. B., D. W. Hommer, A. Pert & L. R. Skirboll (1987) Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculopontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience*, 23, 1011-9.
- Clavier, R. M., S. Atmadja & H. C. Fibiger (1976) Nigrothalamic projections in the rat as demonstrated by orthograde and retrograde tracing techniques. *Brain Res Bull*, 1, 379-84.
- Cobb, W. S. & E. D. Abercrombie (2003) Differential regulation of somatodendritic and nerve terminal dopamine release by serotonergic innervation of substantia nigra. *J Neurochem*, 84, 576-84.
- Coco, S., F. Calegari, E. Pravettoni, D. Pozzi, E. Taverna, P. Rosa, M. Matteoli & C. Verderio. 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. In *J Biol Chem*, 1354-62. United States.
- Conde, H. (1992) Organization and physiology of the substantia nigra. *Exp Brain Res*, 88, 233-48.
- Conn, P. J. & J. P. Pin (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37, 205-37.
- Contreras, J. E., H. A. Sanchez, E. A. Eugenin, D. Speidel, M. Theis, K. Willecke, F. F. Bukauskas, M. V. Bennett & J. C. Saez. (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, 495-500. United States.
- Conway, K. A., S. J. Lee, J. C. Rochet, T. T. Ding, J. D. Harper, R. E. Williamson & P. T. Lansbury, Jr. (2000) Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants. *Ann N Y Acad Sci*, 920, 42-5.
- Cooper, J. A., H. J. Sagar, N. Jordan, N. S. Harvey & E. V. Sullivan (1991) Cognitive impairment in early, untreated Parkinson's disease and its relationship to motor disability. *Brain*, 114 (Pt 5), 2095-122.
- Copray, J. C., R. S. Liem, G. J. Ter Horst & J. D. van Willigen (1990) Dopaminergic afferents to the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: a light and electron microscope immunocytochemistry study. *Brain Res*, 514, 343-8.
- Cossette, M., M. Levesque & A. Parent (1999) Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neurosci Res*, 34, 51-4.
- Costa, S., M. M. Irvani, R. K. Pearce & P. Jenner (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor concentration dependently improves disability and motor activity in MPTP-treated common marmosets. *Eur J Pharmacol*, 412, 45-50.
- Coyle, J. T. (1987) Kainic acid: insights into excitatory mechanisms causing selective neuronal degeneration. *Ciba Found Symp*, 126, 186-203.
- Coyle, J. T. & P. Puttfarcken (1993) Oxidative stress, glutamate, and

- neurodegenerative disorders. *Science*, 262, 689-95.
- Coyle, J. T. & R. Schwarcz (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 263, 244-6.
- Cragg, S. J. & M. E. Rice (2004) DANCing past the DAT at a DA synapse. *Trends Neurosci*, 27, 270-7.
- Cruz-Muros, I., D. Afonso-Oramas, P. Abreu, M. M. Perez-Delgado, M. Rodriguez & T. Gonzalez-Hernandez (2007a) Aging effects on the dopamine transporter expression and compensatory mechanisms. *Neurobiol Aging*.
- Cruz-Muros, I., D. Afonso-Oramas, P. Abreu, M. Rodriguez, M. C. Gonzalez & T. Gonzalez-Hernandez (2007b) Deglycosylation and subcellular redistribution of VMAT2 in the mesostriatal system during normal aging. *Neurobiol Aging*.
- D'Amato, R. J., Z. P. Lipman & S. H. Snyder (1986) Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP⁺ binds to neuromelanin. *Science*, 231, 987-9.
- Dahlstrom, A. & K. Fuxe (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20, 398-9.
- Damier, P., E. C. Hirsch, Y. Agid & A. M. Graybiel (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*, 122 (Pt 8), 1437-48.
- Danbolt, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 65, 1-105.
- Darby, M., J. B. Kuzmiski, W. Panenka, D. Feighan & B. A. MacVicar. 2003. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. In *J Neurophysiol*, 1870-7. United States.
- Darios, F., O. Corti, C. B. Lucking, C. Hampe, M. P. Muriel, N. Abbas, W. J. Gu, E. C. Hirsch, T. Rooney, M. Ruberg & A. Brice (2003) Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet*, 12, 517-26.
- Dauer, W., N. Kholodilov, M. Vila, A. C. Trillat, R. Goodchild, K. E. Larsen, R. Staal, K. Tieu, Y. Schmitz, C. A. Yuan, M. Rocha, V. Jackson-Lewis, S. Hersch, D. Sulzer, S. Przedborski, R. Burke & R. Hen (2002) Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14524-9.
- Dauer, W. & S. Przedborski (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39, 889-909.
- Davies, S. W. & P. J. Roberts (1988) Sparing of cholinergic neurons following quinolinic acid lesions of the rat striatum. *Neuroscience*, 26, 387-93.
- de Groot, J. & H. Sontheimer (2011) Glutamate and the biology of gliomas. *Glia*, 59, 1181-9.
- Del Arco, A., G. Segovia, K. Fuxe & F. Mora. 2003. Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of

- volume transmission mediated actions? In *J Neurochem*, 23-33. England.
- del Olmo, N., M. Galarreta, J. Bustamante, R. Martin del Rio & J. M. Solis. 2000. Taurine-induced synaptic potentiation: role of calcium and interaction with LTP. In *Neuropharmacology*, 40-54. England.
- Deleuze, C., A. Duvoid & N. Hussy (1998) Properties and glial origin of osmotic-dependent release of taurine from the rat supraoptic nucleus. *J Physiol*, 507 (Pt 2), 463-71.
- Deleuze, C., A. Duvoid, F. C. Moos & N. Hussy. 2000. Tyrosine phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic nucleus. In *J Physiol*, 291-9. England.
- Della Corte, L., J. P. Bolam, D. J. Clarke, D. M. Parry & A. D. Smith. 1990. Sites of [3H]taurine Uptake in the Rat Substantia Nigra in Relation to the Release of Taurine from the Striatonigral Pathway. In *Eur J Neurosci*, 50-61.
- DeLong, M. R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*, 13, 281-5.
- Deng, H., J. Jankovic, Y. Guo, W. Xie & W. Le (2005a) Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y. *Biochem Biophys Res Commun*, 337, 1133-8.
- Deng, H., W. D. Le, X. Zhang, T. H. Pan & J. Jankovic (2005b) G309D and W437OPA PINK1 mutations in Caucasian Parkinson's disease patients. *Acta Neurol Scand*, 111, 351-2.
- Deniau, J. M., H. Kita & S. T. Kitai (1992) Patterns of termination of cerebellar and basal ganglia efferents in the rat thalamus. Strictly segregated and partly overlapping projections. *Neurosci Lett*, 144, 202-6.
- Deniau, J. M., A. Menetrey & S. Charpier (1996) The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *Neuroscience*, 73, 761-81.
- Deniau, J. M. & A. M. Thierry (1997) Anatomical segregation of information processing in the rat substantia nigra pars reticulata. *Adv Neurol*, 74, 83-96.
- Dervan, A. G., C. K. Meshul, M. Beales, G. J. McBean, C. Moore, S. Totterdell, A. K. Snyder & G. E. Meredith (2004) Astroglial plasticity and glutamate function in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 190, 145-56.
- Devi, L., V. Raghavendran, B. M. Prabhu, N. G. Avadhani & H. K. Anandatheerthavarada (2008) Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem*, 283, 9089-100.

- Dexter, D. T., C. J. Carter, F. R. Wells, F. Javoy-Agid, Y. Agid, A. Lees, P. Jenner & C. D. Marsden (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 52, 381-9.
- Dhillon, A. S., G. L. Tarbutton, J. L. Levin, G. M. Plotkin, L. K. Lowry, J. T. Nalbhone & S. Shepherd (2008) Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J Agromedicine*, 13, 37-48.
- Di Fonzo, A., C. F. Rohe, J. Ferreira, H. F. Chien, L. Vacca, F. Stocchi, L. Guedes, E. Fabrizio, M. Manfredi, N. Vanacore, S. Goldwurm, G. Breedveld, C. Sampaio, G. Meco, E. Barbosa, B. A. Oostra, V. Bonifati & N. Italian Parkinson Genetics (2005) A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet*, 365, 412-5.
- Di Loreto, S., T. Florio & E. Scarnati (1992) Evidence that non-NMDA receptors are involved in the excitatory pathway from the pedunculopontine region to nigrostriatal dopaminergic neurons. *Exp Brain Res*, 89, 79-86.
- Di Monte, D., S. A. Jewell, G. Ekstrom, M. S. Sandy & M. T. Smith (1986a) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 137, 310-5.
- Di Monte, D., M. S. Sandy, G. Ekstrom & M. T. Smith (1986b) Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 137, 303-9.
- Difazio, M. C., Z. Hollingsworth, A. B. Young & J. B. Penney, Jr. (1992) Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. *Neurology*, 42, 402-6.
- DiFiglia, M., P. Pasik & T. Pasik (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res*, 114, 245-56.
- Dildy-Mayfield, J. E., E. I. Eger, 2nd & R. A. Harris (1996) Anesthetics produce subunit-selective actions on glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 276, 1058-65.
- Doetsch, F., I. Caille, D. A. Lim, J. M. Garcia-Verdugo & A. Alvarez-Buylla (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97, 703-16.
- Dopico, J. G., T. Gonzalez-Hernandez, I. M. Perez, I. G. Garcia, A. M. Abril, J. O. Inchausti & M. Rodriguez Diaz. 2006. Glycine release in the substantia nigra: Interaction with glutamate and GABA. In *Neuropharmacology*, 548-57. England.
- Douaud, G., T. E. Behrens, C. Poupon, Y. Cointepas, S. Jbabdi, V. Gaura, N. Golestani, P. Krystkowiak, C. Verny, P. Damier, A. C. Bachoud-Levi, P. Hantraye & P. Remy (2009) In vivo evidence for the selective subcortical degeneration in Huntington's disease. *Neuroimage*, 46,

- 958-66.
- Double, K. L., D. Ben-Shachar, M. B. Youdim, L. Zecca, P. Riederer & M. Gerlach (2002) Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicol Teratol*, 24, 621-8.
- Dray, A. (1979) The striatum and substantia nigra: a commentary on their relationships. *Neuroscience*, 4, 1407-39.
- Dray, A., T. J. Gonye & N. R. Oakley (1976) Caudate stimulation and substantia nigra activity in the rat. *J Physiol*, 259, 825-49.
- Dronne, M. A., E. Grenier, T. Dumont, M. Hommel & J. P. Boissel (2007) Role of astrocytes in grey matter during stroke: a modelling approach. *Brain Res*, 1138, 231-42.
- Druga, R. (1993) Distribution of the nigropallidal neurons in the rat. (An experimental study using HRP and iron-dextran). *Funct Dev Morphol*, 3, 169-74.
- Du, Y., Z. Ma, S. Lin, R. C. Dodel, F. Gao, K. R. Bales, L. C. Triarhou, E. Chernet, K. W. Perry, D. L. Nelson, S. Luecke, L. A. Phebus, F. P. Bymaster & S. M. Paul (2001) Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14669-74.
- Duan, S., C. M. Anderson, E. C. Keung, Y. Chen & R. A. Swanson. 2003. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. In *J Neurosci*, 1320-8. United States.
- During, M. J., K. M. Ryder & D. D. Spencer (1995) Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature*, 376, 174-7.
- Duvoisin, R. C. (1967) Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism. *Arch Neurol*, 17, 124-36.
- Eberling, J. L., W. J. Jagust, C. W. Christine, P. Starr, P. Larson, K. S. Bankiewicz & M. J. Aminoff (2008) Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*, 70, 1980-3.
- Ehringer, H. & O. Hornykiewicz (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr*, 38, 1236-9.
- El Idrissi, A. & E. Trenkner (1999) Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J Neurosci*, 19, 9459-68.
- El-Sherbeny, A., H. Naggar, S. Miyauchi, M. S. Ola, D. M. Maddox, P. M. Martin, V. Ganapathy & S. B. Smith (2004) Osmoregulation of taurine transporter function and expression in retinal pigment epithelial, ganglion, and muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45, 694-701.
- Engelmann, M., M. Ludwig, N. Singewald, K. Ebner, N. Sabatier, G. Lubec,

- R. Landgraf & C. T. Wotjak. 2001. Taurine selectively modulates the secretory activity of vasopressin neurons in conscious rats. In *Eur J Neurosci*, 1047-55. France.
- Enochs, W. S., T. Sarna, L. Zecca, P. A. Riley & H. M. Swartz (1994) The roles of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 7, 83-100.
- Eshleman, A. J., R. A. Henningsen, K. A. Neve & A. Janowsky (1994) Release of dopamine via the human transporter. *Mol Pharmacol*, 45, 312-6.
- Evanko, D. S., Q. Zhang, R. Zorec & P. G. Haydon (2004) Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia*, 47, 233-40.
- Exner, N., B. Treske, D. Paquet, K. Holmstrom, C. Schiesling, S. Gispert, I. Carballo-Carbajal, D. Berg, H. H. Hoepken, T. Gasser, R. Kruger, K. F. Winklhofer, F. Vogel, A. S. Reichert, G. Auburger, P. J. Kahle, B. Schmid & C. Haass (2007) Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci*, 27, 12413-8.
- Facchini, S., W. Muellbacher, F. Battaglia, B. Boroojerdi & M. Hallett (2002) Focal enhancement of motor cortex excitability during motor imagery: a transcranial magnetic stimulation study. *Acta Neurol Scand*, 105, 146-51.
- Falkenburger, B. H., K. L. Barstow & I. M. Mintz (2001) Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science*, 293, 2465-70.
- Fallon, J. H. & R. Y. Moore (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol*, 180, 545-80.
- Fallon, J. R., R. M. Nitkin, N. E. Reist, B. G. Wallace & U. J. McMahan (1985) Acetylcholine receptor-aggregating factor is similar to molecules concentrated at neuromuscular junctions. *Nature*, 315, 571-4.
- Fasano, M., B. Bergamasco & L. Lopiano (2006) Modifications of the iron-neuromelanin system in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 96, 909-16.
- Faull, R. L. & W. R. Mehlner (1978) The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat. *Neuroscience*, 3, 989-1002.
- Fearnley, J. M. & A. J. Lees (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114 (Pt 5), 2283-301.
- Fellin, T., T. Pozzan & G. Carmignoto. 2006. Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. In

- J Biol Chem*, 4274-84. United States.
- Filion, M., L. Tremblay & P. J. Bedard (1988) Abnormal influences of passive limb movement on the activity of globus pallidus neurons in parkinsonian monkeys. *Brain Res*, 444, 165-76.
- Firestone, J. A., T. Smith-Weller, G. Franklin, P. Swanson, W. T. Longstreth, Jr. & H. Checkoway (2005) Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. *Arch Neurol*, 62, 91-5.
- Fisher, R. S., N. A. Buchwald, C. D. Hull & M. S. Levine (1986) The GABAergic striatonigral neurons of the cat: demonstration by double peroxidase labeling. *Brain Res*, 398, 148-56.
- Fisher, R. S., M. S. Levine, D. R. Sibley & M. A. Ariano (1994) D2 dopamine receptor protein location: Golgi impregnation-gold toned and ultrastructural analysis of the rat neostriatum. *J Neurosci Res*, 38, 551-64.
- Flores-Hernandez, J., E. Galarraga & J. Bargas (1997) Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse*, 25, 185-95.
- Foran, E. & D. Trotti (2009) Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 11, 1587-602.
- Fornai, F., P. Lenzi, M. Gesi, M. Ferrucci, G. Lazzeri, C. L. Busceti, R. Ruffoli, P. Soldani, S. Ruggieri, M. G. Alessandri & A. Paparelli (2003) Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci*, 23, 8955-66.
- Forster, G. L. & C. D. Blaha (2003) Pedunculopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur J Neurosci*, 17, 751-62.
- Foster, J. A., L. Bezin, L. Groc, P. L. Christopherson & R. A. Levine (2003) Kainic acid lesion-induced nigral neuronal death. *J Chem Neuroanat*, 26, 65-73.
- Franco, R., O. Quesada & H. Pasantes-Morales. 2000. Efflux of osmolyte amino acids during isovolumic regulation in hippocampal slices. In *J Neurosci Res*, 701-11. United States: 2000 Wiley-Liss, Inc.
- Franco, R., M. E. Torres-Marquez & H. Pasantes-Morales (2001) Evidence for two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices. *Pflugers Arch*, 442, 791-800.
- Francois, C., C. Savy, C. Jan, D. Tande, E. C. Hirsch & J. Yelnik (2000) Dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the normal state, in MPTP-treated monkeys, and in Parkinson's disease patients. *J Comp Neurol*, 425, 121-9.
- Francois, C., D. Tande, J. Yelnik & E. C. Hirsch (2002) Distribution and morphology of nigral axons projecting to the thalamus in primates. *J*

- Comp Neurol*, 447, 249-60.
- Francois, C., J. Yelnik, D. Tande, Y. Agid & E. C. Hirsch (1999) Dopaminergic cell group A8 in the monkey: anatomical organization and projections to the striatum. *J Comp Neurol*, 414, 334-47.
- Franke, H. & P. Illes. 2006. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. In *Pharmacol Ther*, 297-324. England.
- Franke, H., U. Krugel & P. Illes (2006) P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch*, 452, 622-44.
- Fredenburg, R. A., C. Rospigliosi, R. K. Meray, J. C. Kessler, H. A. Lashuel, D. Eliezer & P. T. Lansbury, Jr. (2007) The impact of the E46K mutation on the properties of alpha-synuclein in its monomeric and oligomeric states. *Biochemistry*, 46, 7107-18.
- Fremeau, R. T., Jr., M. D. Troyer, I. Pahner, G. O. Nygaard, C. H. Tran, R. J. Reimer, E. E. Bellocchio, D. Fortin, J. Storm-Mathisen & R. H. Edwards (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, 31, 247-60.
- Frotscher, M., U. Rinne, R. Hassler & A. Wagner (1981) Termination of cortical afferents on identified neurons in the caudate nucleus of the cat. A combined Golgi-EM degeneration study. *Exp Brain Res*, 41, 329-37.
- Fudge, J. L. & S. N. Haber (2001) Bed nucleus of the stria terminalis and extended amygdala inputs to dopamine subpopulations in primates. *Neuroscience*, 104, 807-27.
- Fujikawa, T., N. Kanada, A. Shimada, M. Ogata, I. Suzuki, I. Hayashi & K. Nakashima. 2005. Effect of sesamin in *Acanthopanax senticosus* HARMS on behavioral dysfunction in rotenone-induced parkinsonian rats. In *Biol Pharm Bull*, 169-72. Japan.
- Fusco, D., M. Vargiolu, M. Vidone, E. Mariani, L. F. Pennisi, E. Bonora, S. Capellari, D. Dirnberger, R. Baumeister, P. Martinelli & G. Romeo (2010) The RET51/FKBP52 complex and its involvement in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 19, 2804-16.
- Futami, T., K. Takakusaki & S. T. Kitai (1995) Glutamatergic and cholinergic inputs from the pedunculopontine tegmental nucleus to dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Neurosci Res*, 21, 331-42.
- Gagne, J. J. & M. C. Power (2010) Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology*, 74, 995-1002.
- Gaig, C., M. J. Marti, M. Ezquerra, A. Cardozo, M. J. Rey & E. Tolosa (2009) G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *BMJ Case Rep*, 2009.
- Gainetdinov, R. R., F. Fumagalli, S. R. Jones & M. G. Caron (1997) Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity:

- evidence from mice lacking the transporter. *J Neurochem*, 69, 1322-5.
- Galluzzi, L., K. Blomgren & G. Kroemer (2009) Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*, 10, 481-94.
- Gao, H. M., J. S. Hong, W. Zhang & B. Liu (2003) Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 23, 1228-36.
- Garcia, A., B. Steiner, G. Kronenberg, A. Bick-Sander & G. Kempermann (2004) Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell*, 3, 363-71.
- Garcia Dopico, J., J. Perdomo Diaz, T. J. Alonso, T. Gonzalez Hernandez, R. Castro Fuentes & M. Rodriguez Diaz (2004) Extracellular taurine in the substantia nigra: taurine-glutamate interaction. *J Neurosci Res*, 76, 528-38.
- Garcia-Munoz, M., S. J. Young & P. M. Groves (1991) Terminal excitability of the corticostriatal pathway. I. Regulation by dopamine receptor stimulation. *Brain Res*, 551, 195-206.
- Garcion, E., L. Sindji, C. Montero-Menei, C. Andre, P. Brachet & F. Darcy (1998) Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Glia*, 22, 282-94.
- Garcion, E., N. Wion-Barbot, C. N. Montero-Menei, F. Berger & D. Wion (2002) New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab*, 13, 100-5.
- Gash, D. M., Z. Zhang & G. Gerhardt (1998) Neuroprotective and neurorestorative properties of GDNF. *Ann Neurol*, 44, S121-5.
- Gaykema, R. P. & L. Zaborszky (1996) Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. II. Substantia nigra-ventral tegmental area projections to cholinergic neurons. *J Comp Neurol*, 374, 555-77.
- Geffen, L. B., T. M. Jessell, A. C. Cuello & L. L. Iversen (1976) Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature*, 260, 258-60.
- Geiger, J. R., T. Melcher, D. S. Koh, B. Sakmann, P. H. Seeburg, P. Jonas & H. Monyer (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*, 15, 193-204.
- Gerfen, C. R. (1984) The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature*, 311, 461-4.
- Gerfen, C. R., K. G. Baimbridge & J. Thibault (1987) The neostriatal mosaic: I. Compartmental organization of projections from the striatum to the

- substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol*, 236, 454-76.
- Gerfen, C. R., K. G. Baimbridge & J. Thibault (1987) The neostriatal mosaic: III. Biochemical and developmental dissociation of patch-matrix mesostriatal systems. *J Neurosci*, 7, 3935-44.
- Gerfen, C. R., M. Herkenham & J. Thibault (1987) The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci*, 7, 3915-34.
- German, D. C., K. Manaye, W. K. Smith, D. J. Woodward & C. B. Saper (1989) Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Ann Neurol*, 26, 507-14.
- German, D. C., K. F. Manaye, P. K. Sonsalla & B. A. Brooks (1992) Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin-D28k-containing cells. *Ann NY Acad Sci*, 648, 42-62.
- Ghasemzadeh, B., J. Cammack & R. N. Adams (1991) Dynamic changes in extracellular fluid ascorbic acid monitored by in vivo electrochemistry. *Brain Res*, 547, 162-6.
- Ghorayeb, I., P. O. Fernagut, L. Hervier, B. Labattu, B. Bioulac & F. Tison (2002) A 'single toxin-double lesion' rat model of striatonigral degeneration by intrastriatal 1-methyl-4-phenylpyridinium ion injection: a motor behavioural analysis. *Neuroscience*, 115, 533-46.
- Gibb, W. R. (1992) Melanin, tyrosine hydroxylase, calbindin and substance P in the human midbrain and substantia nigra in relation to nigrostriatal projections and differential neuronal susceptibility in Parkinson's disease. *Brain Res*, 581, 283-91.
- Giros, B. & M. G. Caron (1993) Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci*, 14, 43-9.
- Glazner, G. W., X. Mu & J. E. Springer (1998) Localization of glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha and c-ret mRNA in rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 391, 42-9.
- Gloeckner, C. J., N. Kinkl, A. Schumacher, R. J. Braun, E. O'Neill, T. Meitinger, W. Kolch, H. Prokisch & M. Ueffing (2006) The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet*, 15, 223-32.
- Gluck, M., J. Ehrhart, E. Jayatilleke & G. D. Zeevalk (2002) Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine: involvement of H₂O₂ and hydroxyl radicals but not glutathione-protein-mixed disulfides. *J Neurochem*, 82, 66-74.
- Goetz, C. G. (1998) New lessons from old drugs: amantadine and Parkinson's disease. *Neurology*, 50, 1211-2.
- Gongora-Alfaro, J. L. (2010) [Caffeine as a preventive drug for Parkinson's disease: epidemiologic evidence and experimental support]. *Rev Neurol*, 50, 221-9.

- Gonzalez-Hernandez, T., P. Abdala & M. Rodriguez (1997) NOS expression in nigral cells after excitotoxic and non-excitotoxic lesion of the pedunculopontine tegmental nucleus. *Eur J Neurosci*, 9, 2658-67.
- Gonzalez-Hernandez, T., P. Barroso-Chinea, A. Acevedo, E. Salido & M. Rodriguez (2001) Colocalization of tyrosine hydroxylase and GAD65 mRNA in mesostriatal neurons. *Eur J Neurosci*, 13, 57-67.
- Gonzalez-Hernandez, T., P. Barroso-Chinea, M. A. Perez de la Cruz, P. Valera, J. G. Dopico & M. Rodriguez (2002) Response of GABAergic cells in the deep mesencephalic nucleus to dopaminergic cell degeneration: an electrophysiological and in situ hybridization study. *Neuroscience*, 113, 311-21.
- Gonzalez-Hernandez, T., P. Barroso-Chinea & M. Rodriguez (2004) Response of the GABAergic and dopaminergic mesostriatal projections to the lesion of the contralateral dopaminergic mesostriatal pathway in the rat. *Mov Disord*, 19, 1029-1042.
- Gonzalez-Hernandez, T. & M. Rodriguez (2000) Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol*, 421, 107-35.
- Gorji, A. (2001) Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Brain Res Rev*, 38, 33-60.
- Gottlieb, M. & C. Matute (1997) Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17, 290-300.
- Goude, R., S. Renaud, S. Bonnassie, T. Bernard & C. Blanco. 2004. Glutamine, glutamate, and alpha-glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. In *Appl Environ Microbiol*, 6535-41. United States.
- Gould, E., N. J. Woolf & L. L. Butcher (1989) Cholinergic projections to the substantia nigra from the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei. *Neuroscience*, 28, 611-23.
- Gracy, K. N., C. L. Clarke, M. B. Meyers & V. M. Pickel (1999) N-methyl-D-aspartate receptor 1 in the caudate-putamen nucleus: ultrastructural localization and co-expression with sorcin, a 22,000 mol. wt calcium binding protein. *Neuroscience*, 90, 107-17.
- Grafman, J., I. Litvan, S. Massaquoi, M. Stewart, A. Sirigu & M. Hallett (1992) Cognitive planning deficit in patients with cerebellar atrophy. *Neurology*, 42, 1493-6.
- Graybiel, A. M. (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci*, 13, 244-54.
- Graybiel, A. M. & C. W. Ragsdale, Jr. (1978) Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 5723-6.

- Greenamyre, J. T., T. B. Sherer, R. Betarbet & A. V. Panov (2001) Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life*, 52, 135-41.
- Greffard, S., M. Verny, A. M. Bonnet, J. Y. Beinis, C. Gallinari, S. Meaume, F. Piette, J. J. Hauw & C. Duyckaerts (2006) Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. *Arch Neurol*, 63, 584-8.
- Greggio, E., S. Jain, A. Kingsbury, R. Bandopadhyay, P. Lewis, A. Kaganovich, M. P. van der Brug, A. Beilina, J. Blackinton, K. J. Thomas, R. Ahmad, D. W. Miller, S. Kesavapany, A. Singleton, A. Lees, R. J. Harvey, K. Harvey & M. R. Cookson (2006) Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol Dis*, 23, 329-41.
- Grofova, I., J. M. Deniau & S. T. Kitai (1982) Morphology of the substantia nigra pars reticulata projection neurons intracellularly labeled with HRP. *J Comp Neurol*, 208, 352-68.
- Grofova, I. & M. Zhou (1998) Nigral innervation of cholinergic and glutamatergic cells in the rat mesopontine tegmentum: light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol*, 395, 359-79.
- Grondin, R., Z. Zhang, A. Yi, W. A. Cass, N. Maswood, A. H. Andersen, D. D. Elsberry, M. C. Klein, G. A. Gerhardt & D. M. Gash (2002) Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. *Brain*, 125, 2191-201.
- Guidetti, P., G. P. Bates, R. K. Graham, M. R. Hayden, B. R. Leavitt, M. E. MacDonald, E. J. Slow, V. C. Wheeler, B. Woodman & R. Schwarcz (2006) Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. *Neurobiol Dis*, 23, 190-7.
- Guridi, J., M. T. Herrero, M. R. Luquin, J. Guillen, M. Ruberg, J. Laguna, M. Vila, F. Javoy-Agid, Y. Agid, E. Hirsch & J. A. Obeso (1996) Subthalamotomy in parkinsonian monkeys. Behavioural and biochemical analysis. *Brain*, 119 (Pt 5), 1717-27.
- Gustavsson, A., M. Svensson, F. Jacobi, C. Allgulander, J. Alonso, E. Beghi, R. Dodel, M. Ekman, C. Faravelli, L. Fratiglioni, B. Gannon, D. H. Jones, P. Jennum, A. Jordanova, L. Jonsson, K. Karampampa, M. Knapp, G. Kobelt, T. Kurth, R. Lieb, M. Linde, C. Ljungcrantz, A. Maercker, B. Melin, M. Moscarelli, A. Musayev, F. Norwood, M. Preisig, M. Pugliatti, J. Rehm, L. Salvador-Carulla, B. Schlehofer, R. Simon, H. C. Steinhausen, L. J. Stovner, J. M. Vallat, P. V. den Bergh, J. van Os, P. Vos, W. Xu, H. U. Wittchen, B. Jonsson & J.

- Olesen. 2011. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. In *Eur Neuropsychopharmacol*, 718-79. Netherlands: 2011. Published by Elsevier B.V.
- Haas, J. & S. L. Erdo (1991) Quisqualate-induced excitotoxic death of glial cells: transient vulnerability of cultured astrocytes. *Glia*, 4, 111-4.
- Haas, R. H., F. Nasirian, K. Nakano, D. Ward, M. Pay, R. Hill & C. W. Shults (1995) Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 37, 714-22.
- Haber, S. N., H. Ryoo, C. Cox & W. Lu (1995) Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol*, 362, 400-10.
- Halliday, G. M. & C. H. Stevens (2011) Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 26, 6-17.
- Hammond, C., J. M. Deniau, A. Rizk & J. Feger (1978) Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat. *Brain Res*, 151, 235-44.
- Hansen, D. V., J. H. Lui, P. R. Parker & A. R. Kriegstein (2010) Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, 464, 554-561.
- Harrower, T. P., A. W. Michell & R. A. Barker (2005) Lewy bodies in Parkinson's disease: protectors or perpetrators? *Exp Neurol*, 195, 1-6.
- Hartmann, A., S. Hunot & E. C. Hirsch. 2003. Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. In *Exp Neurol*, 561-4. United States.
- Hassani, O. K., M. Mouroux & J. Feger (1996) Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience*, 72, 105-15.
- Hasue, R. H. & S. J. Shammah-Lagnado (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol*, 454, 15-33.
- Hattori, T., H. C. Fibiger & P. L. McGeer (1975) Demonstration of a pallido-nigral projection innervating dopaminergic neurons. *J Comp Neurol*, 162, 487-504.
- Hausser, M. A., W. H. Yung & M. G. Lacey. 1992. Taurine and glycine activate the same Cl⁻ conductance in substantia nigra dopamine neurones. In *Brain Res*, 103-8. Netherlands.
- Hay-Schmidt, A. & J. D. Mikkelsen (1992) Demonstration of a neuronal projection from the entopeduncular nucleus to the substantia nigra of the rat. *Brain Res*, 576, 343-7.

- Haydon, P. G. & G. Carmignoto (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev*, 86, 1009-31.
- Hazell, A. S. (2007) Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int*, 50, 941-53.
- Hazell, A. S., Y. Itzhak, H. Liu & M. D. Norenberg (1997) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *J Neurochem*, 68, 2216-9.
- Heimer, L., G. Alheid & L. Zaborszky. 1985. Basal Ganglia. The rat nervous system. In *Forebrain and midbrain*, 37-86. Sydney: (G. Paxinos ed.) Academic Press.
- Helmer, S. D. & J. H. Britt (1985) Mounting behavior as affected by stage of estrous cycle in Holstein heifers. *J Dairy Sci*, 68, 1290-6.
- Henderson, J. M., K. Carpenter, H. Cartwright & G. M. Halliday (2000) Loss of thalamic intralaminar nuclei in progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease: clinical and therapeutic implications. *Brain*, 123 (Pt 7), 1410-21.
- Henderson, J. M., S. B. Schleimer, H. Allbutt, V. Dabholkar, D. Abela, J. Jovic & M. Quinlivan (2005) Behavioural effects of parafascicular thalamic lesions in an animal model of parkinsonism. *Behav Brain Res*, 162, 222-32.
- Hendil, K. B. & E. K. Hoffmann (1974) Cell volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *J Cell Physiol*, 84, 115-25.
- Hepp-Reymond, M., M. Kirkpatrick-Tanner, L. Gabernet, H. X. Qi & B. Weber (1999) Context-dependent force coding in motor and premotor cortical areas. *Exp Brain Res*, 128, 123-33.
- Hermoso, M., C. M. Satterwhite, Y. N. Andrade, J. Hidalgo, S. M. Wilson, B. Horowitz & J. R. Hume. 2002. ClC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes. In *J Biol Chem*, 40066-74. United States.
- Herrera-Marschitz, M., Z. B. You, M. Gojny, J. J. Meana, R. Silveira, O. V. Godukhin, Y. Chen, S. Espinoza, E. Pettersson, C. F. Loidl, G. Lubec, K. Andersson, I. Nylander, L. Terenius & U. Ungerstedt (1996) On the origin of extracellular glutamate levels monitored in the basal ganglia of the rat by in vivo microdialysis. *J Neurochem*, 66, 1726-35.
- Herzog, E., G. C. Bellenchi, C. Gras, V. Bernard, P. Ravassard, C. Bedet, B. Gasnier, B. Giros & S. El Mestikawy (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci*, 21, RC181.
- Hirsch, E., A. M. Graybiel & Y. A. Agid (1988) Melanized dopaminergic

- neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*, 334, 345-8.
- Hofer, A. & R. Dermietzel (1998) Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. *Glia*, 24, 141-54.
- Hoglinger, G. U., J. Feger, A. Prigent, P. P. Michel, K. Parain, P. Champy, M. Ruberg, W. H. Oertel & E. C. Hirsch (2003) Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem*, 84, 491-502.
- Hollmann, M. & S. Heinemann (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17, 31-108.
- Hontanilla, B., A. Parent & J. M. Gimenez-Amaya (1995) Heterogeneous distribution of neurons containing calbindin D-28k and/or parvalbumin in the rat red nucleus. *Brain Res*, 696, 121-6.
- Hoover, J. E. & P. L. Strick (1993) Multiple output channels in the basal ganglia. *Science*, 259, 819-21.
- Hoover, J. E. & P. L. Strick (1999) The organization of cerebellar and basal ganglia outputs to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of herpes simplex virus type 1. *J Neurosci*, 19, 1446-63.
- Horn, A. S. (1990) Dopamine uptake: a review of progress in the last decade. *Prog Neurobiol*, 34, 387-400.
- Hornykiewicz, O. (2006) The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl*, 9-15.
- Hosoi, T. & K. Ozawa (2010) Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin Sci (Lond)*, 118, 19-29.
- Hossmann, K. A. (1994) Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol*, 4, 23-36.
- Hourani, B. T., E. M. Hamlin & T. B. Reynolds (1971) Cerebrospinal fluid glutamine as a measure of hepatic encephalopathy. *Arch Intern Med*, 127, 1033-6.
- Hsu, K. S., C. C. Huang, C. H. Yang & P. W. Gean (1995) Presynaptic D2 dopaminergic receptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in rat neostriatum. *Brain Res*, 690, 264-8.
- Hsu, L. J., Y. Sagara, A. Arroyo, E. Rockenstein, A. Sisk, M. Mallory, J. Wong, T. Takenouchi, M. Hashimoto & E. Masliah (2000) alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol*, 157, 401-10.
- Hu, G., P. Duffy, C. Swanson, M. B. Ghasemzadeh & P. W. Kalivas (1999) The regulation of dopamine transmission by metabotropic glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 289, 412-6.

- Hu, L. F., S. Wang, X. R. Shi, H. H. Yao, Y. H. Sun, J. H. Ding, S. Y. Liu & G. Hu (2005) ATP-sensitive potassium channel opener iptakalim protected against the cytotoxicity of MPP⁺ on SH-SY5Y cells by decreasing extracellular glutamate level. *J Neurochem*, 94, 1570-9.
- Huerta, M. F., D. P. Van Lieshout & J. K. Harting (1991) Nigrotectal projections in the primate Galago crassicaudatus. *Exp Brain Res*, 87, 389-401.
- Hughes, A. J., S. E. Daniel, L. Kilford & A. J. Lees (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinicopathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55, 181-4.
- Hunot, S., F. Boissiere, B. Faucheux, B. Brugg, A. Mouatt-Prigent, Y. Agid & E. C. Hirsch (1996) Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72, 355-63.
- Hurd, Y. L., Z. B. Pristupa, M. M. Herman, H. B. Niznik & J. E. Kleinman (1994) The dopamine transporter and dopamine D2 receptor messenger RNAs are differentially expressed in limbic- and motor-related subpopulations of human mesencephalic neurons. *Neuroscience*, 63, 357-62.
- Hussy, N., C. Deleuze, V. Bres & F. C. Moos (2000) New role of taurine as an osmomediator between glial cells and neurons in the rat supraoptic nucleus. *Adv Exp Med Biol*, 483, 227-37.
- Hutchison, W. D., R. J. Allan, H. Opitz, R. Levy, J. O. Dostrovsky, A. E. Lang & A. M. Lozano (1998) Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 44, 622-8.
- Huxtable, R. J. (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol Rev*, 72, 101-63.
- Imai, Y., M. Soda, H. Inoue, N. Hattori, Y. Mizuno & R. Takahashi (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, 105, 891-902.
- Imamura, K., N. Hishikawa, M. Sawada, T. Nagatsu, M. Yoshida & Y. Hashizume (2003) Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol*, 106, 518-26.
- Ingham, C. A., S. H. Hood & G. W. Arbuthnott (1991) A light and electron microscopical study of enkephalin-immunoreactive structures in the rat neostriatum after removal of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Neuroscience*, 42, 715-30.
- Ingram, S. L., B. M. Prasad & S. G. Amara (2002) Dopamine transporter-mediated conductances increase excitability of midbrain dopamine neurons. *Nat Neurosci*, 5, 971-8.

- Iribe, Y., K. Moore, K. C. Pang & J. M. Tepper (1999) Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro. *J Neurophysiol*, 82, 925-33.
- Irizarry, M. C., W. Growdon, T. Gomez-Isla, K. Newell, J. M. George, D. F. Clayton & B. T. Hyman (1998) Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57, 334-7.
- Jabaudon, D., K. Shimamoto, Y. Yasuda-Kamatani, M. Scanziani, B. H. Gahwiler & U. Gerber (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8733-8.
- Jaffe, E. H., A. Marty, A. Schulte & R. H. Chow (1998) Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *J Neurosci*, 18, 3548-53.
- Jellinger, K. A. (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol*, 14, 153-97.
- Jellinger, K. A. (1999) The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging*, 14, 115-40.
- Jellinger, K. A. (2001) The pathology of Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 86, 55-72.
- Jellinger, K. A. (2009) Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm*, 116, 1111-62.
- Jellinger, K. A., E. Kienzl, G. Rumpelmaier, W. Paulus, P. Riederer, H. Stachelberger, M. B. Youdim & D. Ben-Shachar (1993) Iron and ferritin in substantia nigra in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 60, 267-72.
- Jellinger, K. A. & W. Paulus (1992) Clinico-pathological correlations in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg*, 94 Suppl, S86-8.
- Jenner, P. & C. W. Olanow (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, 47, S161-70.
- Jenner, P. & C. W. Olanow (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 44, S72-84.
- Jeremic, A., K. Jeftinija, J. Stevanovic, A. Glavaski & S. Jeftinija (2001) ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *J Neurochem*, 77, 664-75.
- Johnson, R. D. & J. B. Justice (1983) Model studies for brain dialysis. *Brain Res Bull*, 10, 567-71.
- Jung, J. Y., C. R. Han, Y. J. Jeong, H. J. Kim, H. S. Lim, K. H. Lee, H. O. Park, W. M. Oh, S. H. Kim & W. J. Kim (2007) Epigallocatechin gallate inhibits nitric oxide-induced apoptosis in rat PC12 cells. *Neurosci Lett*, 411, 222-7.

- Juraska, J. M., C. J. Wilson & P. M. Groves (1977) The substantia nigra of the rat: a Golgi study. *J Comp Neurol*, 172, 585-600.
- Kamermans, M., I. Fahrenfort, K. Schultz, U. Janssen-Bienhold, T. Sjoerdsma & R. Weiler. 2001. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. In *Science*, 1178-80. United States.
- Kanazawa, I., G. R. Marshall & J. S. Kelly (1976) Afferents to the rat substantia nigra studied with horseradish peroxidase, with special reference to fibres from the subthalamic nucleus. *Brain Res*, 115, 485-91.
- Kanjhan, R., G. D. Housley, L. D. Burton, D. L. Christie, A. Kippenberger, P. R. Thorne, L. Luo & A. F. Ryan. 1999. Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. In *J Comp Neurol*, 11-32. United States.
- Kaplitt, M. G., A. Feigin, C. Tang, H. L. Fitzsimons, P. Mattis, P. A. Lawlor, R. J. Bland, D. Young, K. Strybing, D. Eidelberg & M. J. During (2007) Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet*, 369, 2097-105.
- Karadottir, R. & D. Attwell (2007) Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience*, 145, 1426-38.
- Karoum, F., S. J. Chrapusta, R. Brinjak, A. Hitri & R. J. Wyatt (1994) Regional effects of amphetamine, cocaine, nomifensine and GBR 12909 on the dynamics of dopamine release and metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol*, 113, 1391-9.
- Kassubek, J., F. D. Juengling, D. Ecker & G. B. Landwehrmeyer (2005) Thalamic atrophy in Huntington's disease co-varies with cognitive performance: a morphometric MRI analysis. *Cereb Cortex*, 15, 846-53.
- Keefe, K. A., A. F. Sved, M. J. Zigmond & E. D. Abercrombie (1993) Stress-induced dopamine release in the neostriatum: evaluation of the role of action potentials in nigrostriatal dopamine neurons or local initiation by endogenous excitatory amino acids. *J Neurochem*, 61, 1943-52.
- Keeney, P. M., J. Xie, R. A. Capaldi & J. P. Bennett, Jr. (2006) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci*, 26, 5256-64.
- Kemp, J. M. & T. P. Powell (1971) The synaptic organization of the caudate nucleus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 262, 403-12.
- Kha, H. T., D. I. Finkelstein, D. Tomas, J. Drago, D. V. Pow & M. K. Horne (2001) Projections from the substantia nigra pars reticulata to the motor thalamus of the rat: single axon reconstructions and immunohistochemical study. *J Comp Neurol*, 440, 20-30.
- Kiebertz, K. (2008) Therapeutic strategies to prevent motor complications in

- Parkinson's disease. *J Neurol*, 255 Suppl 4, 42-5.
- Kim, E. J., K. J. Kwon, J. Y. Park, S. H. Lee, C. H. Moon & E. J. Baik (2002) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on LPS-induced neuronal death in mixed cortical neurons: associated with iNOS and COX-2. *Brain Res*, 941, 1-10
- Kimelberg, H. K., S. K. Goderie, S. Higman, S. Pang & R. A. Waniewski (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci*, 10, 1583-91.
- Kinumi, T., J. Kimata, T. Taira, H. Ariga & E. Niki (2004) Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 317, 722-8.
- Kish, S. J., K. Shannak & O. Hornykiewicz (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med*, 318, 876-80.
- Kita, H. & S. T. Kitai (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol*, 260, 435-52.
- Kitamura, Y., J. Kakimura & T. Taniguchi (2002) Antiparkinsonian drugs and their neuroprotective effects. *Biol Pharm Bull*, 25, 284-90.
- Kitano, H., I. Tanibuchi & K. Jinnai (1998) The distribution of neurons in the substantia nigra pars reticulata with input from the motor, premotor and prefrontal areas of the cerebral cortex in monkeys. *Brain Res*, 784, 228-38.
- Kizer, J. S., M. Palkovits & M. J. Brownstein (1976) The projections of the A8, A9 and A10 dopaminergic cell bodies: evidence for a nigral-hypothalamic-median eminence dopaminergic pathway. *Brain Res*, 108, 363-70.
- Klaus, A., H. Planert, J. J. Hjorth, J. D. Berke, G. Silberberg & J. H. Kotaleski Striatal fast-spiking interneurons: from firing patterns to postsynaptic impact. *Front Syst Neurosci*, 5, 57.
- Knott, C., G. Stern & G. P. Wilkin (2000) Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci*, 16, 724-39.
- Kohutnicka, M., E. Lewandowska, I. Kurkowska-Jastrzebska, A. Czlonkowski & A. Czlonkowska (1998) Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology*, 39, 167-80.
- Koos, T. & J. M. Tepper (2002) Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci*, 22, 529-35.
- Kopin, I. J. (1992) Features of the dopaminergic neurotoxin MPTP. *Ann N Y*

Acad Sci, 648, 96-104.

- Kordower, J. H., M. E. Emborg, J. Bloch, S. Y. Ma, Y. Chu, L. Leventhal, J. McBride, E. Y. Chen, S. Palfi, B. Z. Roitberg, W. D. Brown, J. E. Holden, R. Pyzalski, M. D. Taylor, P. Carvey, Z. Ling, D. Trono, P. Hantraye, N. Deglon & P. Aebischer (2000) Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, 290, 767-73.
- Kordower, J. H., C. D. Herzog, B. Dass, R. A. Bakay, J. Stansell, 3rd, M. Gasmi & R. T. Bartus (2006) Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol*, 60, 706-15.
- Kriegstein, A. & A. Alvarez-Buylla (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-84.
- Krige, D., M. T. Carroll, J. M. Cooper, C. D. Marsden & A. H. Schapira (1992) Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann Neurol*, 32, 782-8.
- Kroemer, G. & K. Blomgren (2007) Mitochondrial cell death control in familial Parkinson disease. *PLoS Biol*, 5, e206.
- Kubota, K., F. Y. Sun, K. Sugaya & N. Sunagane (1986) Reversal of antinociceptive effect of caerulein by benzodiazepine. *J Pharmacobiodyn*, 9, 428-31.
- Kuhn, D. M., D. M. Francescutti-Verbeem & D. M. Thomas (2006) Dopamine quinones activate microglia and induce a neurotoxic gene expression profile: relationship to methamphetamine-induced nerve ending damage. *Ann NY Acad Sci*, 1074, 31-41.
- Kulagina, N. V., M. J. Zigmond & A. C. Michael (2001) Glutamate regulates the spontaneous and evoked release of dopamine in the rat striatum. *Neuroscience*, 102, 121-8.
- Kumar, R., A. E. Lang, M. C. Rodriguez-Oroz, A. M. Lozano, P. Limousin, P. Pollak, A. L. Benabid, J. Guridi, E. Ramos, C. van der Linden, A. Vandewalle, J. Caemaert, E. Lannoo, D. van den Abbeele, G. Vingerhoets, M. Wolters & J. A. Obeso (2000) Deep brain stimulation of the globus pallidus pars interna in advanced Parkinson's disease. *Neurology*, 55, S34-9.
- Kuroda, Y., T. Mitsui, M. Kunishige & T. Matsumoto (2006) Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 787-93.
- Kurth, M. C. & C. H. Adler (1998) COMT inhibition: a new treatment strategy for Parkinson's disease. *Neurology*, 50, S3-14.
- Heimer L, G.F. Alheid & L. Zaborszky (1985) Basal Ganglia. The rat

- nervous system. In *Forebrain and midbrain*, 37-86. Sydney: (G. Paxinos ed.) Academic Press.
- LaFerla, F. M. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 3, 862-72.
- Laird, D. W. (1996) The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J Bioenerg Biomembr*, 28, 311-8.
- Lanciego, J. L., I. P. Lopez, A. J. Rico, M. S. Aymerich, M. Perez-Manso, L. Conte, C. Combarro, E. Roda, C. Molina, N. Gonzalo, M. Castle, T. Tunon, E. Erro & P. Barroso-Chinea (2009) The search for a role of the caudal intralaminar nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*, 78, 55-9.
- Lange, K. W., J. Kornhuber & P. Riederer (1997) Dopamine/glutamate interactions in Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 21, 393-400.
- Langston, J. W., P. Ballard, J. W. Tetrud & I. Irwin (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219, 979-80.
- Langston, J. W., L. S. Forno, J. Tetrud, A. G. Reeves, J. A. Kaplan & D. Karluk (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*, 46, 598-605.
- Lapointe, N., M. St-Hilaire, M. G. Martinoli, J. Blanchet, P. Gould, C. Rouillard & F. Cicchetti (2004) Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J*, 18, 717-9.
- Lavoie, B. & A. Parent (1994a) Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: cholinergic and glutamatergic projections to the substantia nigra. *J Comp Neurol*, 344, 232-41.
- Lavoie, B. & A. Parent (1994b) Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: distribution of cholinergic and monoaminergic neurons in the mesopontine tegmentum with evidence for the presence of glutamate in cholinergic neurons. *J Comp Neurol*, 344, 190-209.
- Lavoie, B., Y. Smith & A. Parent (1989) Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 289, 36-52.
- LaVoie, M. J., B. L. Ostaszewski, A. Weihofen, M. G. Schlossmacher & D. J. Selkoe (2005) Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat Med*, 11, 1214-21.
- Lee, C. R. & J. M. Tepper (2009) Basal ganglia control of substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neural Transm Suppl*, 71-90.
- Lees, A. J., J. Hardy & T. Revesz. 2009. Parkinson's disease. In *Lancet*, 2055-66. England.

- Lees, G. J. (1991) Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev*, 16, 283-300.
- Lefebvre d'Hellencourt, C., C. N. Montero-Menei, R. Bernard & D. Couez (2003) Vitamin D3 inhibits proinflammatory cytokines and nitric oxide production by the EOC13 microglial cell line. *J Neurosci Res*, 71, 575-82.
- Lehmann, A. (1989) Effects of microdialysis-perfusion with anisoosmotic media on extracellular amino acids in the rat hippocampus and skeletal muscle. *J Neurochem*, 53, 525-35.
- Lemberg, A. & M. A. Fernandez (2009) Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Ann Hepatol*, 8, 95-102.
- Leviel, V., A. Cheramy, A. Nieoullon & J. Glowinski (1979) Symmetric bilateral changes in dopamine release from the caudate nuclei of the cat induced by unilateral nigral application of glycine and GABA-related compounds. *Brain Res*, 175, 259-70.
- Levine, J. E. & K. D. Powell (1989) Microdialysis for measurement of neuroendocrine peptides. *Methods Enzymol*, 168, 166-81.
- Levivier, M., S. Przedborski, C. Bencsics & U. J. Kang (1995) Intrastratial implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 15, 7810-20.
- Levy, L. M., O. Warr & D. Attwell (1998) Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J Neurosci*, 18, 9620-8.
- Lewy, F. 1912. Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. 50-55. *Dtsch Z Nervenheilk*.
- Liang, C. L., C. M. Sinton, P. K. Sonsalla & D. C. German (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse that contain calbindin-D28k exhibit reduced vulnerability to MPTP-induced neurodegeneration. *Neurodegeneration*, 5, 313-8.
- Liberatore, G. T., V. Jackson-Lewis, S. Vukosavic, A. S. Mandir, M. Vila, W. G. McAuliffe, V. L. Dawson, T. M. Dawson & S. Przedborski (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med*, 5, 1403-9.
- Lieberman, A., K. Lyons, J. Levine & R. Myerburg (2005) Statins, cholesterol, Co-enzyme Q10, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 11, 81-4.
- Lindfors, N., Y. Yamamoto, T. Pantaleo, H. Lagercrantz, E. Brodin & U. Ungerstedt (1986) In vivo release of substance P in the nucleus

- tractus solitarii increases during hypoxia. *Neurosci Lett*, 69, 94-7.
- Lindquist, N. G., B. S. Larsson & A. Lyden-Sokolowski (1988) Autoradiography of [¹⁴C]paraquat or [¹⁴C]diquat in frogs and mice: accumulation in neuromelanin. *Neurosci Lett*, 93, 1-6.
- Liu, B. & J. S. Hong (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*, 304, 1-7.
- Liu, T. F., H. Y. Li, M. M. Atkinson & R. G. Johnson (1995) Intracellular lucifer yellow leakage from Novikoff cells in the presence of ATP or low extracellular Ca: evidence for hemi-gap junction channels. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 17, 23-8.
- Liu, X., A. J. Bolteus, D. M. Balkin, O. Henschel & A. Bordey (2006) GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia*, 54, 394-410.
- Lo Bianco, C., B. L. Schneider, M. Bauer, A. Sajadi, A. Brice, T. Iwatsubo & P. Aebischer (2004) Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17510-5.
- Lois, C. & A. Alvarez-Buylla (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2074-7.
- Longuemare, M. C. & R. A. Swanson (1995) Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake. *J Neurosci Res*, 40, 379-86.
- Loughlin, S. E. & J. H. Fallon (1984) Substantia nigra and ventral tegmental area projections to cortex: topography and collateralization. *Neuroscience*, 11, 425-35.
- Lowy, M. T., L. Gault & B. K. Yamamoto (1993) Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem*, 61, 1957-60.
- Lucas, D. R. & J. P. Newhouse (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol*, 58, 193-201.
- Luetjens, C. M., N. T. Bui, B. Sengpiel, G. Munstermann, M. Poppe, A. J. Krohn, E. Bauerbach, J. Krieglstein & J. H. Prehn (2000) Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J Neurosci*, 20, 5715-23.
- Luo, J., M. G. Kaplitt, H. L. Fitzsimons, D. S. Zuzga, Y. Liu, M. L. Oshinsky & M. J. During (2002) Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science*, 298, 425-9.
- MacLeod, R. J. & J. R. Hamilton. 1999a. Ca (2+)/Calmodulin kinase II and decreases in intracellular pH are required to activate K(+) channels

- after substantial swelling in villus epithelial cells. In *J Membr Biol*, 59-66. United States.
- MacLeod, R. J. & J. R. Hamilton. 1999b. Increases in intracellular pH and Ca²⁺ are essential for K⁺ channel activation after modest 'physiological' swelling in villus epithelial cells. In *J Membr Biol*, 47-58. United States.
- Maesawa, S., Y. Kaneoke, Y. Kajita, N. Usui, N. Misawa, A. Nakayama & J. Yoshida (2004) Long-term stimulation of the subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats: neuroprotection of dopaminergic neurons. *J Neurosurg*, 100, 679-87.
- Malcangio, M., A. Bartolini, C. Ghelardini, F. Bennardini, P. Malmberg-Aiello, F. Franconi & A. Giotti (1989) Effect of ICV taurine on the impairment of learning, convulsions and death caused by hypoxia. *Psychopharmacology (Berl)*, 98, 316-20.
- Mangano, R. M. & R. Schwarcz (1983) Chronic infusion of endogenous excitatory amino acids into rat striatum and hippocampus. *Brain Res Bull*, 10, 47-51.
- Mangin, J. M., A. Guyon, D. Eugene, D. Paupardin-Tritsch & P. Legendre. 2002. Functional glycine receptor maturation in the absence of glycinergic input in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. In *J Physiol*, 685-97. England.
- Mann, D. M. & P. O. Yates (1983) Possible role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mech Ageing Dev*, 21, 193-203.
- Manning-Bog, A. B., A. L. McCormack, M. G. Purisai, L. M. Bolin & D. A. Di Monte (2003) Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci*, 23, 3095-9.
- Mantz, J., J. B. Lechary, V. Laudenbach, D. Henzel, G. Peytavin & J. M. Desmots (1995) Anesthetics affect the uptake but not the depolarization-evoked release of GABA in rat striatal synaptosomes. *Anesthesiology*, 82, 502-11.
- Marcaggi, P. & D. Attwell (2004) Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. *Glia*, 47, 217-25.
- Marchant, D., J. L. Sylvester & G. M. Earhart (2010) Effects of a short duration, high dose contact improvisation dance workshop on Parkinson disease: a pilot study. *Complement Ther Med*, 18, 184-90.
- Marcusson, J. & K. Eriksson (1988) [³H]GBR-12935 binding to dopamine uptake sites in the human brain. *Brain Res*, 457, 122-9.
- Marks, W. J., Jr., R. T. Bartus, J. Siffert, C. S. Davis, A. Lozano, N. Boulis, J. Vitek, M. Stacy, D. Turner, L. Verhagen, R. Bakay, R. Watts, B. Guthrie, J. Jankovic, R. Simpson, M. Tagliati, R. Alterman, M. Stern, G. Baltuch, P. A. Starr, P. S. Larson, J. L. Ostrem, J. Nutt, K. Kiebertz, J. H. Kordower & C. W. Olanow (2010) Gene delivery of

- AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol*, 9, 1164-72.
- Marks, W. J., Jr., J. L. Ostrem, L. Verhagen, P. A. Starr, P. S. Larson, R. A. Bakay, R. Taylor, D. A. Cahn-Weiner, A. J. Stoessl, C. W. Olanow & R. T. Bartus (2008) Safety and tolerability of intraputaminally delivered CER-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol*, 7, 400-8.
- Marnett, L. J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361-70.
- Marsden, C. D. (1990) Parkinson's disease. *Lancet*, 335, 948-52.
- Marshall, J. F., S. J. O'Dell, R. Navarrete & A. J. Rosenstein (1990) Dopamine high-affinity transport site topography in rat brain: major differences between dorsal and ventral striatum. *Neuroscience*, 37, 11-21.
- Marti, M., S. Sbrenna, K. Fuxe, C. Bianchi, L. Beani & M. Morari. 2000. Increased responsiveness of glutamate release from the substantia nigra pars reticulata to striatal NMDA receptor blockade in a model of Parkinson's disease. A dual probe microdialysis study in hemiparkinsonian rats. In *Eur J Neurosci*, 1848-50. France.
- Martin, D. C., M. Plagenhoef, J. Abraham, R. L. Dennison & R. S. Aronstam (1995) Volatile anesthetics and glutamate activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Biochem Pharmacol*, 49, 809-17.
- Martin, L. J. (2006) Mitochondriopathy in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 1103-10.
- Martinez-Martin, P. & C. F. O'Brien (1998) Extending levodopa action: COMT inhibition. *Neurology*, 50, S27-32; discussion S44-8.
- Martinez-Murillo, R., R. Villalba, M. I. Montero-Caballero & J. Rodrigo (1989) Cholinergic somata and terminals in the rat substantia nigra: an immunocytochemical study with optical and electron microscopic techniques. *J Comp Neurol*, 281, 397-415.
- Maruszak, A., K. Gaweda-Walerych, I. Soltyszewski & C. Zekanowski (2006) Mitochondrial DNA in pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 66, 153-76.
- Maruyama, W., T. Takahashi, M. Youdim & M. Naoi (2002) The anti-Parkinson drug, rasagiline, prevents apoptotic DNA damage induced by peroxynitrite in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neural Transm*, 109, 467-81.
- Mason, P., C. A. Owens & D. L. Hammond (1996) Antagonism of the antinociceptive action of halothane by intrathecal administration of GABAA receptor antagonists. *Anesthesiology*, 84, 1205-14.
- Massieu, L., N. Rocamora, J. M. Palacios, G. Mengod & H. W. Boddeke (1992) Administration of quinolinic acid in the rat hippocampus

- induces expression of c-fos and NGFI-A. *Brain Res Mol Brain Res*, 16, 88-96.
- Mates, J. M., J. A. Segura, J. A. Campos-Sandoval, C. Lobo, L. Alonso, F. J. Alonso & J. Marquez (2009) Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 2051-61.
- Matute, C. (1998) Characteristics of acute and chronic kainate excitotoxic damage to the optic nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10229-34.
- Matute, C., M. Domercq & M. V. Sanchez-Gomez (2006) Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia*, 53, 212-24.
- Matute, C. (2006) Oligodendrocyte NMDA receptors: a novel therapeutic target. In *Trends Mol Med*, 289-92. England.
- Matute, C. (2007) Interaction between glutamate signalling and immune attack in damaging oligodendrocytes. *Neuron Glia Biol*, 3, 281-5.
- Maura, G., A. Giardi & M. Raiteri (1988) Release-regulating D-2 dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther*, 247, 680-4.
- May, P. J. & W. C. Hall (1986) The sources of the nigrotectal pathway. *Neuroscience*, 19, 159-80.
- McCarty, M. F. (2006) Down-regulation of microglial activation may represent a practical strategy for combating neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses*, 67, 251-69.
- McCormack, A. L., M. Thiruchelvam, A. B. Manning-Bog, C. Thiffault, J. W. Langston, D. A. Cory-Slechta & D. A. Di Monte (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis*, 10, 119-27.
- McCormack, J. G., A. P. Halestrap & R. M. Denton (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev*, 70, 391-425.
- McDonald, J. W., S. M. Shapiro, F. S. Silverstein & M. V. Johnston (1998) Role of glutamate receptor-mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the Gunn rat model. *Exp Neurol*, 150, 21-9.
- McGeer, E. G., P. L. McGeer & K. Singh (1978) Kainate-induced degeneration of neostriatal neurons: dependency upon corticostriatal tract. *Brain Res*, 139, 381-3.
- McGeer, P. L., T. Hattori, V. K. Singh & E. G. McGeer (1976) Cholinergic systems in extrapyramidal function. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 55, 213-26.
- McGeer, P. L., S. Itagaki, B. E. Boyes & E. G. McGeer (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-91.
- McGeer, P. L. & E. G. McGeer (2008) Glial reactions in Parkinson's disease.

- Mov Disord*, 23, 474-83.
- McGeer, P. L., E. G. McGeer & J. S. Suzuki (1977) Aging and extrapyramidal function. *Arch Neurol*, 34, 33-5.
- McHaffie, J. G., T. R. Stanford, B. E. Stein, V. Coizet & P. Redgrave (2005) Subcortical loops through the basal ganglia. *Trends Neurosci*, 28, 401-7.
- McNaught, K. S. & P. Jenner (2001) Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 297, 191-4.
- McNaught, K. S., R. Jnobaptiste, T. Jackson & T. A. Jengelly (2010) The pattern of neuronal loss and survival may reflect differential expression of proteasome activators in Parkinson's disease. *Synapse*, 64, 241-50.
- McNaught, K. S., C. Mytilineou, R. Jnobaptiste, J. Yabut, P. Shashidharan, P. Jennert & C. W. Olanow (2002) Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J Neurochem*, 81, 301-6.
- McNaught, K. S. & C. W. Olanow (2003) Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S73-84; discussion S84-6.
- McRitchie, D. A. & G. M. Halliday (1995) Calbindin D28k-containing neurons are restricted to the medial substantia nigra in humans. *Neuroscience*, 65, 87-91.
- McRitchie, D. A., C. D. Hardman & G. M. Halliday (1996) Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. *J Comp Neurol*, 364, 121-50.
- Meltzer, L. T., C. L. Christoffersen & K. A. Serpa (1997) Modulation of dopamine neuronal activity by glutamate receptor subtypes. *Neurosci Biobehav Rev*, 21, 511-8.
- Mena, M. & J. García. 1990. Anatomía y bioquímica de los ganglios basales. 59-70. Jano
- Menendez, N., O. Herreras, J. M. Solis, A. S. Herranz & R. Martin del Rio (1989) Extracellular taurine increase in rat hippocampus evoked by specific glutamate receptor activation is related to the excitatory potency of glutamate agonists. *Neurosci Lett*, 102, 64-9.
- Menendez, N., J. M. Solis, O. Herreras, A. Sanchez Herranz & R. Martin del Rio (1990) Role of endogenous taurine on the glutamate analogue-induced neurotoxicity in the rat hippocampus in vivo. *J Neurochem*, 55, 714-7.
- Mercuri, N., G. Bernardi, P. Calabresi, A. Cotugno, G. Levi & P. Stanzione (1985) Dopamine decreases cell excitability in rat striatal neurons by pre- and postsynaptic mechanisms. *Brain Res*, 358, 110-21.
- Mercuri, N. B., P. Calabresi & G. Bernardi (1988) Potassium ions play a role

- in the glycine-induced inhibition of rat substantia nigra zona compacta neurones. *Brain Res*, 462, 199-203.
- Meshul, C. K., N. Emre, C. M. Nakamura, C. Allen, M. K. Donohue & J. F. Buckman. 1999. Time-dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. In *Neuroscience*, 1-16. United States.
- Miller, R. M., G. L. Kiser, T. Kaysser-Kranich, C. Casaceli, E. Colla, M. K. Lee, C. Palaniappan & H. J. Federoff (2007) Wild-type and mutant alpha-synuclein induce a multi-component gene expression profile consistent with shared pathophysiology in different transgenic mouse models of PD. *Exp Neurol*, 204, 421-32.
- Mills, R. D., C. H. Sim, S. S. Mok, T. D. Mulhern, J. G. Culvenor & H. C. Cheng (2008) Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem*, 105, 18-33.
- Minghetti, L., A. Nicolini, E. Polazzi, C. Creminon, J. Maclouf & G. Levi (1997) Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglial cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E2 and by cyclooxygenase inhibitors. *Glia*, 19, 152-60.
- Missale, C., L. Castelletti, S. Govoni, P. F. Spano, M. Trabucchi & I. Hanbauer (1985) Dopamine uptake is differentially regulated in rat striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem*, 45, 51-6.
- Mitchell, C. H., D. A. Carre, A. M. McGlenn, R. A. Stone & M. M. Civan (1998) A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7174-8.
- Mitchell, P. R. & N. S. Doggett (1980) Modulation of striatal [3H]-glutamic acid release by dopaminergic drugs. *Life Sci*, 26, 2073-81.
- Miyazaki, H., Y. Nakamura, T. Arai & K. Kataoka (1997) Increase of glutamate uptake in astrocytes: a possible mechanism of action of volatile anesthetics. *Anesthesiology*, 86, 1359-66; discussion 8A.
- Miyazaki, I. & M. Asanuma (2009) Approaches to prevent dopamine quinone-induced neurotoxicity. *Neurochem Res*, 34, 698-706.
- Mizuno, Y., S. Ohta, M. Tanaka, S. Takamiya, K. Suzuki, T. Sato, H. Oya, T. Ozawa & Y. Kagawa (1989) Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 163, 1450-5.
- Mizuno, Y., K. Suzuki, N. Sone & T. Saitoh (1988) Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. *Neurosci Lett*, 91, 349-53.
- Mogi, M., M. Harada, T. Kondo, P. Riederer, H. Inagaki, M. Minami & T. Nagatsu (1994) Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*, 180, 147-50.

- Mongin, A. A. & H. K. Kimelberg. 2005. ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca²⁺-sensitive mechanisms. In *Am J Physiol Cell Physiol*, C204-13. United States.
- Montana, V., E. B. Malarkey, C. Verderio, M. Matteoli & V. Parpura (2006) Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia*, 54, 700-15.
- Montana, V., Y. Ni, V. Sunjara, X. Hua & V. Parpura (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*, 24, 2633-42
- Montine, K. S., J. F. Quinn, J. Zhang, J. P. Fessel, L. J. Roberts, 2nd, J. D. Morrow & T. J. Montine (2004) Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids*, 128, 117-24.
- Morales, I., A. Fuentes, T. Gonzalez-Hernandez & M. Rodriguez (2009) Osmosensitive response of glutamate in the substantia nigra. *Exp Neurol*, 220, 335-40.
- Moran, J., S. Morales-Mulia, A. Hernandez-Cruz & H. Pasantes-Morales. 1997. Regulatory volume decrease and associated osmolyte fluxes in cerebellar granule neurons are calcium independent. In *J Neurosci Res*, 144-54. United States.
- Morrison, R. J., S. S. Singhal, A. Bidani, T. A. Heming & S. Awasthi (1998) Glutathione S-transferases of rabbit lung macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*, 148, 229-36.
- Moss, J. & J. P. Bolam (2008) A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J Neurosci*, 28, 11221-30.
- Mount, M. P., A. Lira, D. Grimes, P. D. Smith, S. Faucher, R. Slack, H. Anisman, S. Hayley & D. S. Park (2007) Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 27, 3328-37.
- Muramatsu, S., K. Fujimoto, K. Ikeguchi, N. Shizuma, K. Kawasaki, F. Ono, Y. Shen, L. Wang, H. Mizukami, A. Kume, M. Matsumura, I. Nagatsu, F. Urano, H. Ichinose, T. Nagatsu, K. Terao, I. Nakano & K. Ozawa (2002) Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther*, 13, 345-54.
- Murphy, S. & B. Pearce (1987) Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neuroscience*, 22, 381-94.
- Nagatsu, T., M. Mogi, H. Ichinose & A. Togari (2000a) Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 277-90.
- Nagatsu, T., M. Mogi, H. Ichinose & A. Togari (2000b) Cytokines in

- Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 143-51
- Nakamura, Y., H. Tokuno, T. Moriizumi, Y. Kitao & M. Kudo (1989) Monosynaptic nigral inputs to the pedunculopontine tegmental nucleus neurons which send their axons to the medial reticular formation in the medulla oblongata. An electron microscopic study in the cat. *Neurosci Lett*, 103, 145-50.
- Nandi, D., T. Z. Aziz, N. Giladi, J. Winter & J. F. Stein (2002) Reversal of akinesia in experimental parkinsonism by GABA antagonist microinjections in the pedunculopontine nucleus. *Brain*, 125, 2418-30.
- Narendra, D., A. Tanaka, D. F. Suen & R. J. Youle (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183, 795-803.
- Nauta, H. J. & M. Cole (1978) Efferent projections of the subthalamic nucleus: an autoradiographic study in monkey and cat. *J Comp Neurol*, 180, 1-16.
- Nedergaard, M., T. Takano & A. J. Hansen. 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. In *Nat Rev Neurosci*, 748-55. England.
- Newcomer, T. A., A. M. Palmer, P. A. Rosenberg & E. Aizenman (1993) Nonenzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylalanine to 2,4,5-trihydroxyphenylalanine and 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone in physiological solutions. *J Neurochem*, 61, 911-20.
- Nicklas, W. J., I. Vyas & R. E. Heikkila (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci*, 36, 2503-8.
- Nijijima, K. & M. Yoshida. 1988. Activation of mesencephalic dopamine neurons by chemical stimulation of the nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta. In *Brain Res*, 163-71. Netherlands.
- North, R. A. & A. Surprenant (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 563-80.
- O'Connor, E. R. & H. K. Kimelberg (1993) Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J Neurosci*, 13, 2638-50.
- O'Neill, R. D., M. Fillenz, L. Sundstrom & J. N. Rawlins (1984) Voltammetrically monitored brain ascorbate as an index of excitatory amino acid release in the unrestrained rat. *Neurosci Lett*, 52, 227-33.
- Obeso, J. A., F. Grandas, J. Vaamonde, M. R. Luquin, J. Artieda, G. Lera, M. E. Rodriguez & J. M. Martinez-Lage (1989) Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology*, 39, 11-9

- Obeso, J. A., C. Marin, M. C. Rodríguez-Oroz, J. Blesa, B. Benitez-Temino, J. Mena-Segovia, M. Rodríguez & C. W. Olanow (2008) The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Ann Neurol*, 64 Suppl 2, S30-46.
- Obeso, J. A., M. Rodríguez-Oroz, C. Marin, F. Alonso, I. Zamarbide, J. L. Lanciego & M. Rodríguez-Díaz (2004) The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. *Neurology*, 62, S17-30.
- Obeso, J. A., M. C. Rodríguez-Oroz, P. Chana, G. Lera, M. Rodríguez & C. W. Olanow (2000a) The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology*, 55, S13-20; discussion S21-3.
- Obeso, J. A., M. C. Rodríguez-Oroz, C. G. Goetz, C. Marin, J. H. Kordower, M. Rodríguez, E. C. Hirsch, M. Farrer, A. H. Schapira & G. Halliday (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*, 16, 653-61.
- Obeso, J. A., M. C. Rodríguez-Oroz, M. Rodríguez, J. Arbizu & J. M. Giménez-Amaya (2002) The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci*, 17, 51-5.
- Obeso, J. A., M. C. Rodríguez-Oroz, M. Rodríguez, J. L. Lanciego, J. Artieda, N. Gonzalo & C. W. Olanow (2000b) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 23, S8-19.
- Obrenovitch, T. P. & D. A. Richards (1995) Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 7, 1-54.
- Obrenovitch, T. P. & J. Urenjak. (1997) Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. In *Prog Neurobiol*, 39-87. England.
- Obrenovitch, T. P., J. Urenjak & E. Zilkha (1994) Intracerebral microdialysis combined with recording of extracellular field potential: a novel method for investigation of depolarizing drugs in vivo. *Br J Pharmacol*, 113, 1295-302.
- Obrenovitch, T. P., J. Urenjak & E. Zilkha (1997) Effects of increased extracellular glutamate levels on the local field potential in the brain of anaesthetized rats. *Br J Pharmacol*, 122, 372-8.
- Obrenovitch, T. P., J. Urenjak, E. Zilkha & T. M. Jay (2000) Excitotoxicity in neurological disorders--the glutamate paradox. *Int J Dev Neurosci*, 18, 281-7.
- Oka, A., M. J. Belliveau, P. A. Rosenberg & J. J. Volpe (1993) Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J Neurosci*, 13, 1441-53.
- Olanow, C. W. & W. G. Tatton (1999) Etiology and pathogenesis of

- Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 22, 123-44.
- Omelchenko, N. & S. R. Sesack (2005) Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol*, 483, 217-35.
- Oorschot, D. E. (1996) Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol*, 366, 580-99.
- Ortinski, P. I., J. Dong, A. Mungenast, C. Yue, H. Takano, D. J. Watson, P. G. Haydon & D. A. Coulter (2010) Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nat Neurosci*, 13, 584-91.
- Ouchi, Y., E. Yoshikawa, Y. Sekine, M. Futatsubashi, T. Kanno, T. Ogusu & T. Torizuka (2005) Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 57, 168-75.
- Overstreet, L. S. (2005) Quantal transmission: not just for neurons. In *Trends Neurosci*, 59-62. England.
- Page, G., M. Peeters, M. Najimi, J. M. Maloteaux & E. Hermans (2001) Modulation of the neuronal dopamine transporter activity by the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat striatal synaptosomes through phosphorylation mediated processes. *J Neurochem*, 76, 1282-90.
- Paisan-Ruiz, C., S. Jain, E. W. Evans, W. P. Gilks, J. Simon, M. van der Brug, A. Lopez de Munain, S. Aparicio, A. M. Gil, N. Khan, J. Johnson, J. R. Martinez, D. Nicholl, I. M. Carrera, A. S. Pena, R. de Silva, A. Lees, J. F. Marti-Masso, J. Perez-Tur, N. W. Wood & A. B. Singleton (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44, 595-600.
- Palfi, S. 2008. Towards gene therapy for Parkinson's disease. In *Lancet Neurol*, 375-6. England.
- Palkovits, M., I. Elekes, T. Lang & A. Patthy (1986) Taurine levels in discrete brain nuclei of rats. *J Neurochem*, 47, 1333-5.
- Paquet, M., M. Tremblay, J. J. Soghomonian & Y. Smith (1997) AMPA and NMDA glutamate receptor subunits in midbrain dopaminergic neurons in the squirrel monkey: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neurosci*, 17, 1377-96.
- Parent, A. (1986) *Comparative neurobiology of the basal ganglia*. New York: J. Wiley.
- Parent, A. & F. Cicchetti (1998) The current model of basal ganglia organization under scrutiny. *Mov Disord*, 13, 199-202.
- Parent, A. & L. N. Hazrati. (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. In *Brain Res Brain Res Rev*, 91-127. Netherlands.

- Parent, A. & L. N. Hazrati. (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. In *Brain Res Brain Res Rev*, 128-54. Netherlands.
- Parent, A., A. Mackey, Y. Smith & R. Boucher (1983) The output organization of the substantia nigra in primate as revealed by a retrograde double labeling method. *Brain Res Bull*, 10, 529-37.
- Parent, A. & Y. Smith (1987) Differential dopaminergic innervation of the two pallidal segments in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain Res*, 426, 397-400.
- Parent, A., F. Sato, Y. Wu, J. Gauthier, M. Levesque & M. Parent (2000) Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci*, 23, S20-7.
- Parker, W. D., Jr., J. K. Parks & R. H. Swerdlow (2008) Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res*, 1189, 215-8.
- Parkinson, J. 1817. *An essay on the shaking palsy*. London: Printed by Whittingham and Rowland, for Sherwood, Neely, and Jones.
- Parpura, V., F. Liu, S. Brethorst, K. Jęftinija, S. Jęftinija & P. G. Haydon. 1995. Alpha-latrotoxin stimulates glutamate release from cortical astrocytes in cell culture. In *FEBS Lett*, 266-70. Netherlands.
- Pasantes-Morales, H. & C. Cruz (1984) Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments. *J Neurosci Res*, 11, 303-11.
- Pasantes-Morales, H., R. Franco, B. Ordaz & L. D. Ochoa. (2002) Mechanisms counteracting swelling in brain cells during hyponatremia. In *Arch Med Res*, 237-44. United States.
- Paschen, W. & T. Mengesdorf (2005) Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium*, 38, 409-15.
- Pasti, L., A. Volterra, T. Pozzan & G. Carmignoto (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci*, 17, 7817-30.
- Paul, G., W. Meissner, S. Rein, D. Harnack, C. Winter, K. Hosmann, R. Morgenstern & A. Kupsch (2004) Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 185, 272-80.
- Paxinos, G. & I. Tork. 1990. Neuroanatomical nomenclature. In *Trends Neurosci*, 169. England.
- Peng, J., L. Peng, F. F. Stevenson, S. R. Doctrow & J. K. Andersen (2007) Iron and paraquat as synergistic environmental risk factors in sporadic Parkinson's disease accelerate age-related neurodegeneration. *J Neurosci*, 27, 6914-22.
- Percheron, G. & M. Fillion (1991) Parallel processing in the basal ganglia: up to a point. *Trends Neurosci*, 14, 55-9.

- Perez-Lloret, S. & O. Rascol (2011) Safety of rasagiline for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Drug Saf*, 10, 633-43.
- Perry, V. H. & S. Gordon (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci*, 11, 273-7.
- Pessiglione, M., D. Guehl, A. S. Rolland, C. Francois, E. C. Hirsch, J. Feger & L. Tremblay (2005) Thalamic neuronal activity in dopamine-depleted primates: evidence for a loss of functional segregation within basal ganglia circuits. *J Neurosci*, 25, 1523-31.
- Pessiglione, M., D. Guehl, A. S. Rolland, C. Francois, E. C. Hirsch, J. Feger & L. Tremblay (2005) Thalamic neuronal activity in dopamine-depleted primates: evidence for a loss of functional segregation within basal ganglia circuits. *J Neurosci*, 25, 1523-31.
- Petit, A., T. Kawarai, E. Paitel, N. Sanjo, M. Maj, M. Scheid, F. Chen, Y. Gu, H. Hasegawa, S. Salehi-Rad, L. Wang, E. Rogaeva, P. Fraser, B. Robinson, P. St George-Hyslop & A. Tandon (2005) Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem*, 280, 34025-32.
- Piallat, B., A. Benazzouz & A. L. Benabid (1996) Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur J Neurosci*, 8, 1408-14.
- Pierce, R. C. & G. V. Rebec (1993) Intraneostriatal administration of glutamate antagonists increases behavioral activation and decreases neostriatal ascorbate via nondopaminergic mechanisms. *J Neurosci*, 13, 4272-80.
- Plaitakis, A. & P. Shashidharan (2000) Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol*, 247 Suppl 2, II25-35.
- Poewe, W. (2009) Treatments for Parkinson disease--past achievements and current clinical needs. *Neurology*, 72, S65-73.
- Poon, H. F., M. Frasier, N. Shreve, V. Calabrese, B. Wolozin & D. A. Butterfield (2005) Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice--a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 18, 492-8.
- Pothos, E. N., S. Przedborski, V. Davila, Y. Schmitz & D. Sulzer (1998) D2-Like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells. *J Neurosci*, 18, 5575-85.
- Prasad, K. N., W. C. Cole, A. R. Hovland, K. C. Prasad, P. Nahreini, B. Kumar, J. Edwards-Prasad & C. P. Andreatta (1999) Multiple antioxidants in the prevention and treatment of neurodegenerative disease: analysis of biologic rationale. *Curr Opin Neurol*, 12, 761-70.

- Pratico, D. (2001) In vivo measurement of the redox state. *Lipids*, 36 Suppl, S45-7.
- Prensa, L., M. Cossette & A. Parent (2000) Dopaminergic innervation of human basal ganglia. *J Chem Neuroanat*, 20, 207-13.
- Prensa, L. & A. Parent (2001) The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci*, 21, 7247-60.
- Priller, J., A. Flugel, T. Wehner, M. Boentert, C. A. Haas, M. Prinz, F. Fernandez-Klett, K. Prass, I. Bechmann, B. A. de Boer, M. Frotscher, G. W. Kreutzberg, D. A. Persons & U. Dirnagl (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med*, 7, 1356-61.
- Przedborski, S. & V. Jackson-Lewis (1998) Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord*, 13 Suppl 1, 35-8.
- Pycock, C. J. 1980. Turning behaviour in animals. In *Neuroscience*, 461-514. England.
- Qin, L., Y. Liu, C. Cooper, B. Liu, B. Wilson & J. S. Hong (2002) Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem*, 83, 973-83.
- Queiroz, G., P. J. Gebicke-Haerter, A. Schobert, K. Starke & I. von Kugelgen. 1997. Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. In *Neuroscience*, 1203-8. United States.
- Quist, A. P., S. K. Rhee, H. Lin & R. Lal (2000) Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *J Cell Biol*, 148, 1063-74.
- Raivich, G., M. Bohatschek, C. U. Kloss, A. Werner, L. L. Jones & G. W. Kreutzberg (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*, 30, 77-105.
- Ransmayr, G. (2011) Physical, occupational, speech and swallowing therapies and physical exercise in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 118, 773-81.
- Rappold, P. M. & K. Tieu (2010) Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*, 7, 413-23.
- Rebec, G. V. & Z. Wang (2001) Behavioral activation in rats requires endogenous ascorbate release in striatum. *J Neurosci*, 21, 668-75.
- Rebec, G. V., S. R. Witowski, M. I. Sandstrom, R. D. Rostand & R. T. Kennedy (2005) Extracellular ascorbate modulates cortically evoked glutamate dynamics in rat striatum. *Neurosci Lett*, 378, 166-70.
- Redgrave, P., L. Marrow & P. Dean. 1992. Topographical organization of the

- nigrotectal projection in rat: evidence for segregated channels. In *Neuroscience*, 571-95. England.
- Reiner, A. & K. D. Anderson (1990) The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Res Brain Res Rev*, 15, 251-65.
- Remy, P., M. Doder, A. Lees, N. Turjanski & D. Brooks (2005) Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*, 128, 1314-22.
- Rescigno, A., A. C. Rinaldi & E. Sanjust (1998) Some aspects of tyrosine secondary metabolism. *Biochem Pharmacol*, 56, 1089-96.
- Reynolds, B. A. & S. Weiss (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707-10.
- Rice, M. E. & S. J. Cragg (2008) Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Res Rev*, 58, 303-13.
- Rinne, U. K., J. P. Larsen, A. Siden & J. Worm-Petersen (1998) Entacapone enhances the response to levodopa in parkinsonian patients with motor fluctuations. Nomecomt Study Group. *Neurology*, 51, 1309-14.
- Rinvik, E. & O. P. Ottersen. 1993. Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat. In *J Chem Neuroanat*, 19-30. England.
- Rizzo, V., A. Anesi, L. Montalbetti, G. Bellantoni, R. Trotti & G. V. Melzi d'Eril (1996) Reference values of neuroactive amino acids in the cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 729, 181-8.
- Rizzuto, R. & T. Pozzan (2006) Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*, 86, 369-408.
- Robinson, M. B. (1998) The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int*, 33, 479-91.
- Rochet, J. C., T. F. Outeiro, K. A. Conway, T. T. Ding, M. J. Volles, H. A. Lashuel, R. M. Bieganski, S. L. Lindquist & P. T. Lansbury (2004) Interactions among alpha-synuclein, dopamine, and biomembranes: some clues for understanding neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*, 23, 23-34.
- Rodrigues, R. J., T. Almeida, P. J. Richardson, C. R. Oliveira & R. A. Cunha. 2005. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2,

- and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. In *J Neurosci*, 6286-95. United States.
- Rodriguez Diaz, M., P. Abdala, P. Barroso-Chinea, J. Obeso & T. Gonzalez-Hernandez (2001) Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 122, 79-92.
- Rodriguez Diaz, M., T. J. Alonso, J. Perdomo Diaz, T. Gonzalez Hernandez, R. Castro Fuentes, M. Sabate & J. Garcia Dopico (2005) Glial regulation of nonsynaptic extracellular glutamate in the substantia nigra. *Glia*, 49, 134.
- Rodriguez M. et al. (2011). Gene Therapy for Parkinson's Disease: Towards Non Invasive Approaches, Towards New Therapies for Parkinson's Disease, David I. Finkelstein (Ed.), ISBN: 978-953-307-463-4, InTech,
- Rodriguez, M., P. Barroso-Chinea, P. Abdala, J. Obeso & T. Gonzalez-Hernandez (2001) Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in parkinson's disease. *Exp Neurol*, 169, 163-81.
- Rodriguez, M., L. Alvarez-Erviti, F. J. Blesa, M. C. Rodriguez-Oroz, A. Arina, I. Melero, L. I. Ramos & J. A. Obeso (2007) Bone-marrow-derived cell differentiation into microglia: a study in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 28, 316-25.
- Rodriguez, M., P. Barroso-Chinea, P. Abdala, J. Obeso & T. Gonzalez-Hernandez (2001b) Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in parkinson's disease. *Exp Neurol*, 169, 163-81.
- Rodriguez, M., M. A. Castellano & M. D. Palarea (1990) Interhemispheric regulation of dopaminergic ascending systems. *Life Sci*, 47, 377-84.
- Rodriguez, M. & R. Castro (1991) Apomorphine lowers dopamine synthesis for up to 48 h: implications for drug sensitization. *Neuroreport*, 2, 365-8.
- Rodriguez, M. & T. Gonzalez-Hernandez (1999) Electrophysiological and morphological evidence for a GABAergic nigrostriatal pathway. *J Neurosci*, 19, 4682-94.
- Rodriguez, M., B. Mantolan-Sarmiento & T. Gonzalez-Hernandez (1998) Effects of ethylcholine mustard azirinium ion (AF64A) on the choline acetyltransferase and nitric oxide synthase activities in mesopontine cholinergic neurons of the rat. *Neuroscience*, 82, 853-66.
- Rodriguez, M., I. Morales, I. Gomez, S. Gonzalez, T. Gonzalez-Hernandez & J. L. Gonzalez-Mora (2006) Heterogeneous dopamine neurochemistry in the striatum: the fountain-drain matrix. *J Pharmacol Exp Ther*,

319, 31-43.

- Rodriguez, M. C., J. A. Obeso & C. W. Olanow (1998) Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol*, 44, S175-88.
- Rodriguez-Oroz, M. C., A. Gorospe, J. Guridi, E. Ramos, G. Linazasoro, M. Rodriguez-Palmero, J. A. Obeso, R. Kumar, A. E. Lang, A. M. Lozano, P. Limousin, P. Pollak, A. L. Benabid, C. van der Linden, A. Vandewalle, J. Caemaert, E. Lannoo, D. van den Abbeele, G. Vingerhoets & M. Wolters (2000) Bilateral deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease
- Rodriguez-Oroz, M. C., M. Jahanshahi, P. Krack, I. Litvan, R. Macias, E. Bezard & J. A. Obeso (2009) Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol*, 8, 1128-39.
- Rodriguez-Oroz, M. C., M. Rodriguez, J. Guridi, K. Mewes, V. Chockkman, J. Vitek, M. R. DeLong & J. A. Obeso (2001) The subthalamic nucleus in Parkinson's disease: somatotopic organization and physiological characteristics. *Brain*, 124, 1777-90.
- Roffler-Tarlov, S., D. F. Sharman & P. Tegerdine (1971) 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid in the mouse striatum: a reflection of intra- and extra-neuronal metabolism of dopamine? *Br J Pharmacol*, 42, 343-51.
- Rommelfanger, K. S. & T. Wichmann Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat*, 4, 139.
- Rosenberg, P. A. (1991) Accumulation of extracellular glutamate and neuronal death in astrocyte-poor cortical cultures exposed to glutamine. *Glia*, 4, 91-100.
- Rothstein, J. D., M. Dykes-Hoberg, C. A. Pardo, L. A. Bristol, L. Jin, R. W. Kuncl, Y. Kanai, M. A. Hediger, Y. Wang, J. P. Schielke & D. F. Welty. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. In *Neuron*, 675-86. United States.
- Rowlands, G. F. & P. J. Roberts (1980) Activation of dopamine receptors inhibits calcium-dependent glutamate release from cortico-striatal terminals in vitro. *Eur J Pharmacol*, 62, 241-2.
- Rouillard, C. & A. S. Freeman (1995) Effects of electrical stimulation of the central nucleus of the amygdala on the in vivo electrophysiological activity of rat nigral dopaminergic neurons. *Synapse*, 21, 348-56.
- Rozza, A., E. Masoero, L. Favalli, E. Lanza, S. Govoni, V. Rizzo & L. Montalbetti. 2000. Influence of different anaesthetics on extracellular aminoacids in rat brain. In *J Neurosci Methods*, 165-9. Netherlands.
- Ruottinen, H. M. & U. K. Rinne (1998) COMT inhibition in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol*, 245, P25-34.

- Saavedra, H., E. Motles, C. Infante & J. Leiva (1987) Evidence for a nigro-pulvinar-lateralis posterior complex projection in the cat using horseradish peroxidase neuronal retrograde technique. *Arch Ital Biol*, 125, 59-70.
- Sabate, M., I. Gonzalez, F. Ruperez & M. Rodriguez (1996a) Obstructive and restrictive pulmonary dysfunctions in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 138, 114-9.
- Sabate, M., C. Llanos & M. Rodriguez (2008) Integration of auditory and kinesthetic information in motion: alterations in Parkinson's disease. *Neuropsychology*, 22, 462-8.
- Sabate, M., M. Rodriguez, E. Mendez, E. Enriquez & I. Gonzalez (1996b) Obstructive and restrictive pulmonary dysfunction increases disability in Parkinson disease. *Arch Phys Med Rehabil*, 77, 29-34.
- Sadikot, A. F., A. Parent & C. Francois (1992) Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: a PHA-L study of subcortical projections. *J Comp Neurol*, 315, 137-59.
- Sakai, S. T. & A. Smith (1992) Distribution of nigrothalamic projections in the dog. *J Comp Neurol*, 318, 83-92.
- Salamon, G., P. Martini, F. Ternier, E. Vibert, N. Murayama & E. Khadr (1991) Topographical study of supratentorial brain tumors. *J Neuroradiol*, 18, 123-40.
- Salazar, M., T. D. Sokoloski & P. N. Patil (1978) Binding of dopaminergic drugs by the neuromelanin of the substantia nigra, synthetic melanins and melanin granules. *Fed Proc*, 37, 2403-7.
- Sanchez-Ramos, J. R., F. Hefti & W. J. Weiner (1987) Paraquat and Parkinson's disease. *Neurology*, 37, 728.
- Sato, K., J. H. Zhang, T. Saika, M. Sato, K. Tada & M. Tohyama. 1991. Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: an analysis using in situ hybridization histochemistry. In *Neuroscience*, 381-95. England.
- Saulskaya, N. & C. A. Marsden. (1995a) Extracellular glutamate in the nucleus accumbens during a conditioned emotional response in the rat. In *Brain Res*, 114-20. Netherlands.
- Saulskaya, N. & C. A. Marsden (1995b) Extracellular glutamate in the nucleus accumbens during a conditioned emotional response in the rat. *Brain Res*, 698, 114-20.
- Scanziani, M. 2002. Competing on the edge. In *Trends Neurosci*, 282-3. England.
- Scarnati, E., E. Campana & C. Pacitti (1984) Pedunculopontine-evoked excitation of substantia nigra neurons in the rat. *Brain Res*, 304, 351-61.
- Scarnati, E., F. Hajdu, C. Pacitti & T. Tombol (1988) An EM and Golgi study

- on the connection between the nucleus tegmenti pedunculopontinus and the pars compacta of the substantia nigra in the rat. *J Hirnforsch*, 29, 95-105.
- Scarnati, E., A. Proia, E. Campana & C. Pacitti (1986) A microiontophoretic study on the nature of the putative synaptic neurotransmitter involved in the pedunculopontine-substantia nigra pars compacta excitatory pathway of the rat. *Exp Brain Res*, 62, 470-8.
- Schapira, A. H. (2008) Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 7, 97-109.
- Schapira, A. H. & M. Gegg (2011) Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinsons Dis*, 2011, 159160.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, D. Dexter, J. B. Clark, P. Jenner & C. D. Marsden (1990a) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 54, 823-7.
- Schapira, A. H. & M. Gegg (2011) Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinsons Dis*, 2011, 159160.
- Schapira, A. H., V. M. Mann, J. M. Cooper, D. Dexter, S. E. Daniel, P. Jenner, J. B. Clark & C. D. Marsden (1990b) Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 55, 2142-5.
- Scheffler, B., N. M. Walton, D. D. Lin, A. K. Goetz, G. Enikolopov, S. N. Roper & D. A. Steindler (2005) Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9353-8.
- Schousboe, A. & H. Pasantes-Morales (1989) Potassium-stimulated release of [3H]taurine from cultured GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurochem*, 53, 1309-15.
- Schrag, A., R. Dodel, A. Spottke, B. Bornschein, U. Siebert & N. P. Quinn (2007) Rate of clinical progression in Parkinson's disease. A prospective study. *Mov Disord*, 22, 938-45.
- Schubert, D. & D. Piasecki (2001) Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J Neurosci*, 21, 7455-62.
- Schuler, F. & J. E. Casida (2001) The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Manag Sci*, 57, 932-40.
- Schultz, W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*, 80, 1-27.
- Schultz, W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36, 241-63.
- Schurr, A., M. T. Tseng, C. A. West & B. M. Rigor (1987) Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an in vitro study. *Life Sci*, 40, 2059-66.
- Schwartzkroin, P. A., S. C. Baraban & D. W. Hochman. 1998. Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability. In *Epilepsy Res*, 275-85.

- Netherlands.
- Schwiebert, E. M., M. E. Egan, T. H. Hwang, S. B. Fulmer, S. S. Allen, G. R. Cutting & W. B. Guggino. 1995. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. In *Cell*, 1063-73. United States.
- Sedaghat, K., D. I. Finkelstein & A. L. Gundlach (2009) Effect of unilateral lesion of the nigrostriatal dopamine pathway on survival and neurochemistry of parafascicular nucleus neurons in the rat-evaluation of time-course and LGR8 expression. *Brain Res*, 1271, 83-94.
- Semchuk, K. M., E. J. Love & R. G. Lee (1992) Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*, 42, 1328-35.
- Shah, I. M. & M. Di Napoli (2007) The ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibitors in central nervous system diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 7, 250-73.
- Shammah-Lagnado, S. J., G. F. Alheid & L. Heimer (1999) Afferent connections of the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure and adjacent amygdalostriatal transition area in the rat. *Neuroscience*, 94, 1097-123.
- Sheldon, A. L. & M. B. Robinson (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int*, 51, 333-55.
- Sherer, T. B., R. Betarbet, C. M. Testa, B. B. Seo, J. R. Richardson, J. H. Kim, G. W. Miller, T. Yagi, A. Matsuno-Yagi & J. T. Greenamyre (2003) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 23, 10756-64.
- Shima, T., T. Sarna, H. M. Swartz, A. Stroppolo, R. Gerbasi & L. Zecca (1997) Binding of iron to neuromelanin of human substantia nigra and synthetic melanin: an electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Free Radic Biol Med*, 23, 110-9.
- Shimada, S., S. Kitayama, D. Walther & G. Uhl (1992) Dopamine transporter mRNA: dense expression in ventral midbrain neurons. *Brain Res Mol Brain Res*, 13, 359-62.
- Shimura, H., N. Hattori, S. Kubo, M. Yoshikawa, T. Kitada, H. Matsumine, S. Asakawa, S. Minoshima, Y. Yamamura, N. Shimizu & Y. Mizuno (1999) Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol*, 45, 668-72.
- Shinohara, K., S. Honma, Y. Katsuno & K. Honma. 2000. Circadian release of excitatory amino acids in the suprachiasmatic nucleus culture is Ca(2+)-independent. In *Neurosci Res*, 245-50. Ireland.
- Shuaib, A., K. Xu, B. Crain, A. L. Siren, G. Feuerstein, J. Hallenbeck & J. N.

- Davis (1990) Assessment of damage from implantation of microdialysis probes in the rat hippocampus with silver degeneration staining. *Neurosci Lett*, 112, 149-54.
- Shui, H., Y. Peng, R. Wu & Y. Tsai (2000) Evaluation of L-DOPA biotransformation during repeated L-DOPA infusion into the striatum in freely-moving young and old rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 121, 123-31.
- Shulman, J. M., P. L. De Jager & M. B. Feany (2011) Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 6, 193-222.
- Singhal, N. K., G. Srivastava, D. K. Patel, S. K. Jain & M. P. Singh (2011) Melatonin or silymarin reduces maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse. *J Pineal Res*, 50, 97-109.
- Singleton, A. B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M. R. Cookson, M. Muentner, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy & K. Gwinn-Hardy (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302, 841.
- Smith, A. D. & J. P. Bolam (1990a) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci*, 13, 259-65.
- Smith, Y., M. D. Bevan, E. Shink & J. P. Bolam (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, 86, 353-87.
- Smith, Y. & J. P. Bolam (1989) Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res*, 493, 160-7.
- Smith, Y. & J. P. Bolam (1990b) The output neurones and the dopaminergic neurones of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol*, 296, 47-64.
- Smith, Y. & J. P. Bolam (1991) Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labelling study. *Neuroscience*, 44, 45-73.
- Smith, Y., L. N. Hazrati & A. Parent (1990) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as studied by the PHA-L anterograde tracing method. *J Comp Neurol*, 294, 306-23.
- Smith, Y., D. Raju, B. Nanda, J. F. Pare, A. Galvan & T. Wichmann (2009) The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Res Bull*, 78, 60-8.
- Smith, Y., D. V. Raju, J. F. Pare & M. Sidibe (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci*, 27, 520-7.
- Sofic, E., W. Paulus, K. Jellinger, P. Riederer & M. B. Youdim (1991)

- Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem*, 56, 978-82.
- Sofroniew, M. V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638-47.
- Sofroniew, M. V. & H. V. Vinters (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119, 7-35.
- Somogyi, P., J. P. Bolam & A. D. Smith (1981) Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. *J Comp Neurol*, 195, 567-84.
- Somogyi, P. & A. D. Smith (1979) Projection of neostriatal spiny neurons to the substantia nigra. Application of a combined Golgi-staining and horseradish peroxidase transport procedure at both light and electron microscopic levels. *Brain Res*, 178, 3-15.
- Sonsalla, P. K., D. S. Albers & G. D. Zeevalk (1998) Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids*, 14, 69-74.
- Sonsalla, P. K., G. D. Zeevalk, L. Manzano, A. Giovanni & W. J. Nicklas (1992) MK-801 fails to protect against the dopaminergic neuropathology produced by systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice or intranigral 1-methyl-4-phenylpyridinium in rats. *J Neurochem*, 58, 1979-982.
- Spann, B. M. & I. Grofova (1991) Nigropedunculopontine projection in the rat: an anterograde tracing study with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol*, 311, 375-88.
- Spencer, J. P., P. Jenner, S. E. Daniel, A. J. Lees, D. C. Marsden & B. Halliwell (1998) Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem*, 71, 2112-22.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes & M. Goedert (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388, 839-40.
- Stadtman, E. R. (2001) Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 928, 22-38.
- Stover, N. P., R. A. Bakay, T. Subramanian, C. D. Raiser, M. L. Cornfeldt, A. W. Schweikert, R. C. Allen & R. L. Watts (2005) Intrastriatal implantation of human retinal pigment epithelial cells attached to microcarriers in advanced Parkinson disease. *Arch Neurol*, 62, 1833-7.
- Strange, K., F. Emma & P. S. Jackson (1996) Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am J Physiol*, 270, C711-30.
- Streit, W. J., S. A. Walter & N. A. Pennell (1999) Reactive microgliosis. *Prog*

- Neurobiol*, 57, 563-81.
- Striessnig, J., A. Koschak, M. J. Sinnegger-Brauns, A. Hetzenauer, N. K. Nguyen, P. Busquet, G. Pelster & N. Singewald (2006) Role of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel isoforms for brain function. *Biochem Soc Trans*, 34, 903-9.
- Stutzin, A., R. Torres, M. Oporto, P. Pacheco, A. L. Eguiguren, L. P. Cid & F. V. Sepulveda (1999) Separate taurine and chloride efflux pathways activated during regulatory volume decrease. *Am J Physiol*, 277, C392-402.
- Sulzer, D., J. Bogulavsky, K. E. Larsen, G. Behr, E. Karatekin, M. H. Kleinman, N. Turro, D. Krantz, R. H. Edwards, L. A. Greene & L. Zecca (2000) Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11869-74.
- Sulzer, D. & Y. Schmitz (2007) Parkinson's disease: return of an old prime suspect. *Neuron*, 55, 8-10.
- Surmeier, D. J., J. Ding, M. Day, Z. Wang & W. Shen (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*, 30, 228-35.
- Suzuki, S. O. & J. E. Goldman (2003) Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J Neurosci*, 23, 4240-50.
- Swanson, C. R., V. Joers, V. Bondarenko, K. Brunner, H. A. Simmons, T. E. Ziegler, J. W. Kemnitz, J. A. Johnson & M. E. Emborg (2011) The PPAR-gamma agonist pioglitazone modulates inflammation and induces neuroprotection in parkinsonian monkeys. *J Neuroinflammation*, 8, 91.
- Swanson, R. A., W. Ying & T. M. Kauppinen (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med*, 4, 193-205.
- Swartz, H. M., T. Sarna & L. Zecca (1992) Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions. *Ann Neurol*, 32 Suppl, S69-75.
- Taira, T., Y. Saito, T. Niki, S. M. Iguchi-Ariga, K. Takahashi & H. Ariga (2004) DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*, 5, 213-8.
- Takada, M. & T. Hattori (1986) Collateral projections from the substantia nigra to the cingulate cortex and striatum in the rat. *Brain Res*, 380, 331-5.
- Takahashi, H., E. Ohama, S. Suzuki, Y. Horikawa, A. Ishikawa, T. Morita, S. Tsuji & F. Ikuta (1994) Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family. *Neurology*, 44, 437-41.
- Takahashi, N., L. L. Miner, I. Sora, H. Ujike, R. S. Revay, V. Kostic, V.

- Jackson-Lewis, S. Przedborski & G. R. Uhl (1997) VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9938-43.
- Takeuchi, H., S. Jin, J. Wang, G. Zhang, J. Kawanokuchi, R. Kuno, Y. Sonobe, T. Mizuno & A. Suzumura (2006) Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*, 281, 21362-8.
- Tan, E. K., K. Yew, E. Chua, K. Puvan, H. Shen, E. Lee, K. Y. Puong, Y. Zhao, R. Pavanni, M. C. Wong, D. Jamora, D. de Silva, K. T. Moe, F. P. Woon, Y. Yuen & L. Tan (2006) PINK1 mutations in sporadic early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21, 789-93.
- Tanaka, K., K. Watase, T. Manabe, K. Yamada, M. Watanabe, K. Takahashi, H. Iwama, T. Nishikawa, N. Ichihara, T. Kikuchi, S. Okuyama, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto & K. Wada (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, 276, 1699-702.
- Taylor, T. N., W. M. Caudle, K. R. Shepherd, A. Noorian, C. R. Jackson, P. M. Iuvone, D. Weinshenker, J. G. Greene & G. W. Miller (2009) Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. *J Neurosci*, 29, 8103-13.
- Teismann, P. & J. B. Schulz (2004) Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res*, 318, 149-61.
- Tepper, J. M., S. F. Sawyer & P. M. Groves (1987) Electrophysiologically identified nigral dopaminergic neurons intracellularly labeled with HRP: light-microscopic analysis. *J Neurosci*, 7, 2794-806.
- Thannickal, T. C., Y. Y. Lai & J. M. Siegel (2007) Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. *Brain*, 130, 1586-95.
- Thornburg, J. E. & K. E. Moore (1975) Supersensitivity to dopamine agonists following unilateral, 6-hydroxydopamine-induced striatal lesions in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 192, 42-9.
- Timmerman, W. & B. H. Westerink. 1997. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? In *Synapse*, 242-61. United States.
- Tokunaga, M., N. Seneca, R. M. Shin, J. Maeda, S. Obayashi, T. Okauchi, Y. Nagai, M. R. Zhang, R. Nakao, H. Ito, R. B. Innis, C. Halldin, K. Suzuki, M. Higuchi & T. Suhara (2009) Neuroimaging and physiological evidence for involvement of glutamatergic transmission in regulation of the striatal dopaminergic system. *J Neurosci*, 29, 1887-96.
- Tossmann, U. & U. Ungerstedt (1986) Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta Physiol*

Scand, 128, 9-14.

- Toth, E. & A. Lajtha (1989) Motor effects of intracaudate injection of excitatory amino acids. *Pharmacol Biochem Behav*, 33, 175-9.
- Trenkner, E. (1990) Possible role of glutamate with taurine in neuron-glia interaction during cerebellar development. *Prog Clin Biol Res*, 351, 133-40.
- Tucci, S., P. Rada & L. Hernandez. 1998. Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. In *Brain Res*, 44-9. Netherlands: 1998 Elsevier Science B.V.
- Turner-Stokes, L. & D. Jackson (2002) Shoulder pain after stroke: a review of the evidence base to inform the development of an integrated care pathway. *Clin Rehabil*, 16, 276-98.
- Turski, L., K. Bressler, K. J. Rettig, P. A. Loschmann & H. Wachtel (1991) Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature*, 349, 414-8.
- Tuz, K., B. Ordaz, L. Vaca, O. Quesada & H. Pasantes-Morales (2001) Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 79, 143-51.
- Uhl, G. R., D. Walther, D. Mash, B. Faucheux & F. Javoy-Agid (1994) Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann Neurol*, 35, 494-8.
- Ungerstedt, U. (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl*, 367, 1-48.
- Valente, E. M., P. M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M. M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A. R. Bentivoglio, D. G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W. P. Gilks, D. S. Latchman, R. J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger & N. W. Wood (2004a) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304, 1158-60.
- Valente, E. M., S. Salvi, T. Ialongo, R. Marongiu, A. E. Elia, V. Caputo, L. Romito, A. Albanese, B. Dallapiccola & A. R. Bentivoglio (2004b) PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*, 56, 336-41.
- Van der Werf, Y. D., M. P. Witter & H. J. Groenewegen (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res Brain Res Rev*, 39, 107-40.
- Vankova, M., M. Arluison, V. Leviel & G. Tramu (1992) Afferent connections of the rat substantia nigra pars lateralis with special reference to peptide-containing neurons of the amygdalo-nigral pathway. *J Chem Neuroanat*, 5, 39-50.
- Vercelli, A., G. Marini & G. Tredici (2003) Anatomical organization of the

- telencephalic connections of the parafascicular nucleus in adult and developing rats. *Eur J Neurosci*, 18, 275-89.
- Verity, M. A. (1991) Use and abuse of tissue culture in neurotoxicity studies: overview of the session. *Neurotoxicology*, 12, 457-8.
- Verma, A. & B. Moghaddam (1998) Regulation of striatal dopamine release by metabotropic glutamate receptors. *Synapse*, 28, 220-6.
- Vesce, S., D. Rossi, L. Brambilla & A. Volterra (2007) Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol*, 82, 57-71.
- Vila, M., R. Levy, M. T. Herrero, B. Faucheux, J. A. Obeso, Y. Agid & E. C. Hirsch (1996) Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neuroscience*, 71, 903-12.
- Villalba, R. M. & Y. Smith (2011) Neuroglial plasticity at striatal glutamatergic synapses in Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci*, 5, 68.
- Vitek, J. L., V. Chockkan, J. Y. Zhang, Y. Kaneoke, M. Evatt, M. R. DeLong, S. Triche, K. Mewes, T. Hashimoto & R. A. Bakay (1999) Neuronal activity in the basal ganglia in patients with generalized dystonia and hemiballismus. *Ann Neurol*, 46, 22-35.
- Von Krosigk, M. & A. D. Smith (1991) Descending Projections from the Substantia Nigra and Retrorubral Field to the Medullary and Pontomedullary Reticular Formation. *Eur J Neurosci*, 3, 260-273.
- Wagner, A. K., J. E. Sokoloski, D. Ren, X. Chen, A. S. Khan, R. D. Zafonte, A. C. Michael & C. E. Dixon (2005) Controlled cortical impact injury affects dopaminergic transmission in the rat striatum. *J Neurochem*, 95, 457-65.
- Wallace, L. J. & J. S. Traeger (2012) Dopac distribution and regulation in striatal dopaminergic varicosities and extracellular space. *Synapse*, 66, 160-73.
- Wang, W., K. Ameno, M. Jamal, M. Kumihashi, I. Uekita, S. Ameno & I. Ijiri (2007) Effect of direct infusion of acetaldehyde on dopamine and dopamine-derived salsolinol in the striatum of free-moving rats using a reverse microdialysis technique. *Arch Toxicol*, 81, 121-6.
- Watase, K., K. Hashimoto, M. Kano, K. Yamada, M. Watanabe, Y. Inoue, S. Okuyama, T. Sakagawa, S. Ogawa, N. Kawashima, S. Hori, M. Takimoto, K. Wada & K. Tanaka (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci*, 10, 976-88.
- Weintraub, M. I. & M. H. Van Woert (1971) Reversal by levodopa of cholinergic hypersensitivity in Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 284, 412-5.

- Westerink, B. H., F. J. Bosker & E. Wirix (1984) Formation and metabolism of dopamine in nine areas of the rat brain: modifications by haloperidol. *J Neurochem*, 42, 1321-7.
- Westerink, B. H. & F. M. Van Putten (1987) Simultaneous determination of the rates of synthesis and metabolism of dopamine in various areas of the rat brain: application to the effects of (+)-amphetamine. *Eur J Pharmacol*, 133, 103-10.
- Whitton, P. S. (1997) Glutamatergic control over brain dopamine release in vivo and in vitro. *Neurosci Biobehav Rev*, 21, 481-8.
- Wieraszko, A., G. Goldsmith & T. N. Seyfried. 1989. Stimulation-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slices. In *Brain Res*, 244-50. Netherlands.
- Wightman, R. M. & J. B. Zimmerman (1990) Control of dopamine extracellular concentration in rat striatum by impulse flow and uptake. *Brain Res Brain Res Rev*, 15, 135-44.
- Williams, M. N. & R. L. Faull (1985) The striatonigral projection and nigrotectal neurons in the rat. A correlated light and electron microscopic study demonstrating a monosynaptic striatal input to identified nigrotectal neurons using a combined degeneration and horseradish peroxidase procedure. *Neuroscience*, 14, 991-1010.
- Wilms, H., P. Rosenstiel, J. Sievers, G. Deuschl, L. Zecca & R. Lucius (2003) Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J*, 17, 500-2.
- Wilson, A. A., D. P. Johnson, D. Mozley, D. Hussey, N. Ginovart, J. Nobrega, A. Garcia, J. Meyer & S. Houle. 2003. Synthesis and in vivo evaluation of novel radiotracers for the in vivo imaging of the norepinephrine transporter. In *Nucl Med Biol*, 85-92. England.
- Wu, D. C., P. Teismann, K. Tieu, M. Vila, V. Jackson-Lewis, H. Ischiropoulos & S. Przedborski (2003) NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6145-50.
- Wullner, U., C. M. Testa, M. V. Catania, A. B. Young & J. B. Penney, Jr. (1994) Glutamate receptors in striatum and substantia nigra: effects of medial forebrain bundle lesions. *Brain Res*, 645, 98-102.
- Xu, J., H. Peng, N. Kang, Z. Zhao, J. H. Lin, P. K. Stanton & J. Kang (2007) Glutamate-induced exocytosis of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem*, 282, 24185-97.
- Xue, C. J., J. P. Ng, Y. Li & M. E. Wolf (1996) Acute and repeated systemic amphetamine administration: effects on extracellular glutamate, aspartate, and serine levels in rat ventral tegmental area and nucleus accumbens. *J Neurochem*, 67, 352-63.

- Yamada, T., P. L. McGeer, K. G. Baimbridge & E. G. McGeer (1990) Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Res*, 526, 303-7.
- Yamamoto, M. & A. H. Schapira (2008) Dopamine agonists in Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*, 8, 671-7.
- Yasui, Y., T. Tsumori, A. Ando & T. Domoto (1995) Demonstration of axon collateral projections from the substantia nigra pars reticulata to the superior colliculus and the parvocellular reticular formation in the rat. *Brain Res*, 674, 122-6.
- Yasui, Y., T. Tsumori, A. Ando, T. Domoto, T. Kayahara & K. Nakano (1994) Descending projections from the superior colliculus to the reticular formation around the motor trigeminal nucleus and the parvocellular reticular formation of the medulla oblongata in the rat. *Brain Res*, 656, 420-6.
- Ye, G., A. C. Tse & W. Yung. 1997. Taurine inhibits rat substantia nigra pars reticulata neurons by activation of GABA- and glycine-linked chloride conductance. In *Brain Res*, 175-9. Netherlands.
- Yeager, M. & B. J. Nicholson. 1996. Structure of gap junction intercellular channels. In *Curr Opin Struct Biol*, 183-92. England.
- Yoshioka, A., M. Hardy, D. P. Younkin, J. B. Grinspan, J. L. Stern & D. Pleasure (1995) Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors mediate excitotoxicity in the oligodendroglial lineage. *J Neurochem*, 64, 2442-8.
- Yousefi, B., V. Tadibi, A. F. Khoei & A. Montazeri (2009) Exercise therapy, quality of life, and activities of daily living in patients with Parkinson disease: a small scale quasi-randomised trial. *Trials*, 10, 67.
- Zafar, K. S., D. Siegel & D. Ross (2006) A potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. *Mol Pharmacol*, 70, 1079-86.
- Zecca, L., R. Fariello, P. Riederer, D. Sulzer, A. Gatti & D. Tampellini (2002a) The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett*, 510, 216-20.
- Zecca, L., D. Tampellini, A. Gatti, R. Crippa, M. Eisner, D. Sulzer, S. Ito, R. Fariello & M. Gallorini (2002b) The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals. *J Neural Transm*, 109, 663-72.
- Zecca, L., F. A. Zucca, H. Wilms & D. Sulzer (2003) Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci*, 26, 578-80.
- Zeevalk, G. D., D. Schoepp & W. J. Nicklas (1995) Excitotoxicity at both

- NMDA and non-NMDA glutamate receptors is antagonized by aurintricarboxylic acid: evidence for differing mechanisms of action. *J Neurochem*, 64, 1749-58.
- Zemke, D. & A. Majid (2004) The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. *Clin Neuropharmacol*, 27, 293-8.
- Zetterstrom, T., T. Sharp, A. K. Collin & U. Ungerstedt (1988) In vivo measurement of extracellular dopamine and DOPAC in rat striatum after various dopamine-releasing drugs; implications for the origin of extracellular DOPAC. *Eur J Pharmacol*, 148, 327-34.
- Zhang, F., J. S. Shi, H. Zhou, B. Wilson, J. S. Hong & H. M. Gao (2010) Resveratrol protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity through its anti-inflammatory actions. *Mol Pharmacol*, 78, 466-77.
- Zhang, H. & D. Sulzer (2004) Frequency-dependent modulation of dopamine release by nicotine. *Nat Neurosci*, 7, 581-2.
- Zhang, L., M. Shimoji, B. Thomas, D. J. Moore, S. W. Yu, N. I. Marupudi, R. Torp, I. A. Torgner, O. P. Ottersen, T. M. Dawson & V. L. Dawson (2005) Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet*, 14, 2063-73.
- Zhang, R. L., Y. LeTourneau, S. R. Gregg, Y. Wang, Y. Toh, A. M. Robin, Z. G. Zhang & M. Chopp (2007) Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J Neurosci*, 27, 3157-62.
- Zigmond, M. J., E. D. Abercrombie, T. W. Berger, A. A. Grace & E. M. Stricker (1990) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci*, 13, 290-6.
- Zoli, M., C. Torri, R. Ferrari, A. Jansson, I. Zini, K. Fuxe & L. F. Agnati (1998) The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res Brain Res Rev*, 26, 136-47.
- Zuddas, A., G. Oberto, F. Vaglini, F. Fascetti, F. Fornai & G. U. Corsini (1992) MK-801 prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in primates. *J Neurochem*, 59, 733-9.
- Zurn, A. D., H. R. Widmer & P. Aebischer (2001) Sustained delivery of GDNF: towards a treatment for Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 36, 222-9.

LISTADOS**ABREVIATURAS**

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
ATP	Adenosín trifosfato
Cy2	Molécula fluorescente de cianina (510nm)
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2 ,3-dionina disódico
COMT	Catecol-o-metil-transferasa
DA	Dopamina
DAérgica	Dopaminérgica
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DAT	Transportador de dopamina
DOPAC	3,4 dihidroxifenil acético
EAAT2	Transportador de aminoácidos excitatorios 2
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GB	Ganglios basales
GLU	Glutamato
GFAP	Proteína fibrilar ácida de astrocitos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAO	Monoamino-oxidasa
2MeSATP	2-metil-tio-ATP
MSO	Metionina sulfoximina
NeuN	Proteína de núcleo neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato

NGS	Suero normal de cabra
6-OHDA	6-hidroxidopamina
PBS	Tampón fosfato salino
PDC	L-tras-pirrolidin-2,4-dicarboxilato
PFA	Paraformaldehido
PPADS	Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico
TH	Tirosina hidroxilasa
vGLU _t	Transportador vesicular de glutamato

TABLAS

<i>Tabla 1. Componentes del equitensín.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 2. Coordenadas estereotáxicas de las zonas donde se realizaron los trabajos experimentales (Paxinos y Watson, 1986).....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 3. Cánula de microdiálisis: materiales y medidas.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 4. Composición de la solución de perfusión: LCR o Ringer.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 5. Reactivos perfundidos por la cánula de microdiálisis en los distintos experimentos.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 6. Componentes del equipo de HPLC.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 7. Programa del gradiente en el análisis de aminoácidos.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 8. Reactivos empleados en el análisis de aminoácidos por HPLC.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 9. Reactivos empleados como patrones de aminoácidos.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 10. Componentes del equipo de HPLC para la determinación de catecolaminas.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 11. Reactivos empleados en la fase móvil del HPLC para determinar catecolaminas .Modificación del eluyente de Shui (Shui et al., 2000).....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 12. Reactivos empleados en la determinación de las catecolaminas.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 13. Tampón fosfato salino o PBS 1M.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 14. Lista y concentraciones de anticuerpos primarios utilizados.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 15. Lista y concentraciones de anticuerpos secundarios, estravidinas y reactivos utilizados</i>	<i>66</i>

FIGURAS

- Figura 0. Porcentaje de recuperación de la cánula “in vitro” para aminoácidos.....48*
- Figura 1. Porcentaje de recuperación de la cánula “in vitro” para aminoácidos.....53*
- Figura 2. Cromatograma o “perfil de elución” del patrón de aminoácidos.....58*
- Figura 3. Curva de calibrado con los valores obtenidos de la altura o del área del pico del cromatograma o “perfil de elución”..... 59*
- Figura 4. Cromatograma del patrón de la dopamina y de distintos metabolitos relacionados con ella respecto al tiempo en el que fueron tomados..... 61*
- Figura 5. Efecto inespecífico de la cánula de microdiálisis en los astrocitos y en la microglía.....75*
- Figura 6. Vista axial de la gliosis reactiva alrededor de la zona de inserción de la cánula de microdiálisis después la perfusión de glutamato.....81*
- Figura 7. Vista axial de la astrogliosis reactiva y de la acumulación activa de glutamato alrededor de la zona de inserción de la cánula de microdiálisis después de la perfusión de glutamato.....82*
- Figura 8. Astrogliosis reactiva y acumulación de glutamato tras la perfusión activa de glutamato: las diferencias entre el estriado perfundido contralateral, el perfundido con el vehículo y el estriado perfundido con la solución de glutamato.....84*
- Figura 9. Gliosis reactiva y degeneración neuronal después de la perfusión de glutamato: efectos a largo plazo..... 85*
- Figura 10. Gliosis reactiva y acumulación de glutamato tras la perfusión activa de glutamato: efectos a largo plazo 87*
- Figura 11. Metabolización del glutamato después de administrar PDC, MSO y glutamato: estudio mediante microdiálisis 89*
- Figura 12.A. Vista axial del sistema dopaminérgico nigroestriatal. B-E. Posición dorso-ventral de la cánula de microdiálisis..... 98*
- Figura 13. A. Picos cromatográficos típicos de aspartato y glutamato (Glu) de las muestras obtenidas fuera (solución 100 μ M) vs interior (ringer) de la membrana de la cánula de microdiálisis durante los ensayos “in vitro” de la tasa de transferencia de*

una cánula. B. Cambios del GLU extracelular durante la perfusión de dopamina (DA).
C. Cambios del glutamato extracelular durante la perfusión de haloperidol..... 99

Figura 14. Ejemplos que muestran la distribución típica de la microglía activada (CD68), las neuronas (NeuN) y la innervación dopaminérgica (TH) en el tejido estriatal que rodeaba a la cánula de microdiálisis (cortes perpendiculares a la trayectoria de la cánula)101

Figura 15. La denervación tálamo-estriatal y nigro-estriatal después de la perfusión de glutamato en el estriado. A: sinapsis dopaminérgicas del estriado no lesionado distribuidas alrededor de los tractos estriatales, vasos y neuronas. B-C: innervación dopaminérgica en las regiones del estriado circundantes a la cánula de microdiálisis que presentó o no pérdida neuronal. D-G: innervación tálamo-estriatal alrededor de la cánula de microdiálisis donde se observó pérdida de la misma e innervación tálamo-estriatal en la región homóloga del estriado contralateral.....102

Figura 16. La distribución de las células mesencefálicas a diferentes distancias desde la superficie de la corteza cerebral104

Figura 17. Neuronas de los núcleos intralaminares del tálamo después de la perfusión de ringer (control), glutamato 1 mM, NMDA 0,5 mM, AMPA 0,5 mM y kainato 0,5 mM (KA).....105

Figura 18. Células de la microglía activada y neuronas en los núcleos intralaminares tras de las lesiones del estriado.....106

Figura 19: Efecto del glutamato sobre el nivel extracelular de dopamina y DOPAC en el estriado.....114

Figura 20. Efecto del glutamato en el nivel extracelular de dopamina y DOPAC en la sustancia negra.....114

Figura 21: Efecto del ácido ascórbico en el nivel extracelular de dopamina y DOPAC en el estriado.....116

Figura 22. Efecto del ácido ascórbico y de la dopamina sobre el nivel extracelular de glutamato y glutamina en el estriado.....116

Figura 23: Efecto del haloperidol sobre el nivel extracelular de glutamato y glutamina en el estriado..... 118

<i>Figura 24: Efecto de la levodopa en el nivel extracelular de la dopamina, el DOPAC, la glutamina y el glutamato en un estriado denervado.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 25. Incremento dosis dependiente de la taurina extrasináptico durante la perfusión de ringer hipo-osmótico (130 mOsm) en la sustancia negra.....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 26. Inhibición de la respuesta de la taurina en la sustancia negra al sustituir el cloruro sódico omitido en la solución de perfusión por cloruro de colina.....</i>	<i>128</i>
<i>Figura 27. Respuesta de la taurina nigral a pulsos fuertemente hipo-osmolares (80 mOsm) durante la perfusión de ringer iso-osmótico (285 mOsm) y durante la perfusión de ringer ligeramente hipo-osmótico (210 mOsm).....</i>	<i>129</i>
<i>Figura 28. Disminución de la taurina extrasináptica de la sustancia negra después de haber aumentado la tonicidad por encima de lo normal (285 mOsm) o por encima de una solución ligeramente hipotónica (230 mOsm) respecto a la solución ringer basal</i>	<i>130</i>
<i>Figura 29. Liberación de glutamato durante la perfusión de un pulso hipo-osmolar (130 mOsm).....</i>	<i>131</i>
<i>Figura 30. Liberación de taurina durante la administración de un pulso hipo-osmolar en condiciones basales y después de un tratamiento previo con 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-dionina disódico (500µM CNQX).....</i>	<i>132</i>
<i>Figura31. Respuesta de la taurina al incremento de ATP.....</i>	<i>133</i>
<i>Figura 32. Liberación de taurina durante la perfusión continua de 100 µM de ATP.....</i>	<i>134</i>
<i>Figura 33. Liberación de taurina en la sustancia negra durante la administración de un pulso hipo-osmolar en condiciones basales y después de realizar un tratamiento previo con 100 µM ATP.....</i>	<i>135</i>
<i>Figura 34 Liberación de taurina en la sustancia negra como respuesta a la administración continuada de 1 mM de ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico (PPADS).....</i>	<i>136</i>
<i>Figura 35. Liberación de taurina en la sustancia negra durante la administración de un pulso hipo-osmolar en condiciones basales (izquierda) y después de realizar un tratamiento previo con 1 mM PPADS (derecha).....</i>	<i>137</i>

- Figura 36. Liberación de glutamato en la sustancia negra bajo condiciones hipo-osmóticas. Aumento del glutamato extracelular no sináptico de forma dosis dependiente (285-80 mOsm) durante la perfusión de LCR hipo-osmótico..... 138*
- Figura 37. Respuesta del glutamato a la administración pulsátil de adenosina (1 mM durante 10 min)..... 139*
- Figura 38. Respuesta del glutamato al ATP y a la administración 2MeSATP: curva tiempo-respuesta al ATP, al 2MeSATP y al LCR (pulsos de 5 min administrados a partir del minuto 0 al minuto 5)..... 140*
- Figura 39. Curva dosis-respuesta de la acción del ATP en los niveles de glutamato extracelular extrasináptico de la sustancia negra (pulsos de 5 min administrado desde el minuto 0 al minuto 5)..... 141*
- Figura 40. Receptores P2 de nucleótidos y la respuesta del glutamato a la baja osmolaridad: efecto al bloquear los receptores P2 con PPADS. 142*
- Figura 41. El efecto del bloqueo de los receptores ionotrópicos de glutamato con CNQX sobre el glutamato extracelular extrasináptico de la sustancia negra..... 143*
- Figura 42. Respuesta del glutamato extracelular extrasináptico nigral a un pulso de baja osmolaridad (180 mOsm durante 10 min) previo tratamiento con CNQX (bloqueante de receptores ionotrópicos de glutamato)..... 144*

PUBLICACIONES RELACIONADAS

Substantia nigra osmoregulation: taurine and ATP involvement

Ingrid Morales, Jose G. Dopico, Magdalena Sabate, Tomas Gonzalez-Hernandez and Manuel Rodriguez

Am J Physiol Cell Physiol 292:C1934-C1941, 2007. First published 10 January 2007;
doi:10.1152/ajpcell.00593.2006

You might find this additional info useful...

This article cites 93 articles, 25 of which can be accessed free at:

<http://ajpcell.physiology.org/content/292/5/C1934.full.html#ref-list-1>

This article has been cited by 2 other HighWire hosted articles

Taurine Biosynthesis by Neurons and Astrocytes

Victor Vitvitsky, Sanjay K. Garg and Ruma Banerjee
J. Biol. Chem., September 16, 2011; 286 (37): 32002-32010.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Receptor regulation of osmolyte homeostasis in neural cells

Stephen K. Fisher, Anne M. Heacock, Richard F. Keep and Daniel J. Foster
J Physiol, September 15, 2010; 588 (18): 3355-3364.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:

<http://ajpcell.physiology.org/content/292/5/C1934.full.html>

Additional material and information about *AJP - Cell Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpcell>

This information is current as of January 22, 2012.

Substantia nigra osmoregulation: taurine and ATP involvement

Ingrid Morales,¹ Jose G. Dopico,¹ Magdalena Sabate,³
Tomas Gonzalez-Hernandez,² and Manuel Rodriguez¹

¹Laboratory of Neurobiology and Experimental Neurology, Department of Physiology,
and Departments of ²Anatomy and ³Pharmacology and Physical Medicine, Faculty
of Medicine, University of La Laguna, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

Submitted 29 November 2006; accepted in final form 2 January 2007

Morales I, Dopico JG, Sabate M, Gonzalez-Hernandez T, Rodriguez M. Substantia nigra osmoregulation: taurine and ATP involvement. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1934–C1941, 2007. First published January 10, 2007; doi:10.1152/ajpcell.00593.2006.—An extracellular nonsynaptic taurine pool of glial origin was recently reported in the substantia nigra (SN). There is previous evidence showing taurine as an inhibitory neurotransmitter in the SN, but the physiological role of this nonsynaptic pool of taurine has not been explored. By using microdialysis methods, we studied the action of local osmolarity on the nonsynaptic taurine pool in the SN of the rat. Hypoosmolar pulses (285–80 mosM) administered in the SN by the microdialysis probe increased extrasynaptic taurine in a dose-dependent way, a response that was counteracted by compensating osmolarity with choline. The opposite effect (taurine decrease) was observed when osmolarity was increased. Under basal conditions, the blockade of either the AMPA-kainate glutamate receptors with 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium or the purinergic receptors with pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid modified the taurine concentration, suggesting that both receptors modulate the extrasynaptic pool of taurine. In addition, these drugs decreased the taurine response to hypoosmolar pulses, suggesting roles for glutamatergic and purinergic receptors in the taurine response to osmolarity. The participation of purinergic receptors was also supported by the fact that ATP (which, under basal conditions, increased the extrasynaptic taurine in a dose-dependent way) administered in doses saturating purinergic receptors also decreased the taurine response to hypoosmolarity. Taken together, present data suggest osmoregulation as a role of the nonsynaptic taurine pool of the SN, a function that also involves glutamate and ATP and that could influence the nigral cell vulnerability in Parkinson's disease.

substantia nigra; swelling; Parkinson's disease

SUBSTANTIA NIGRA IS A MESENCEPHALIC nucleus that has been extensively studied during the last 40 years because of its role as a main output center of basal ganglia (BG) and its involvement in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). Substantia nigra (SN) is composed of dopaminergic and GABAergic cells (29, 66), which receive glutamatergic, GABAergic, nitri-nergic, and cholinergic synaptic inputs from different brain structures (47, 70, 72, 83). Taurine, a very abundant β -amino acid in the mammalian brain (37) and particularly in the SN (1, 65), has also been supported as a nigral neurotransmitter (2, 17, 32, 42, 46, 51, 76, 92). Thus taurine is released by striatonigral neurons (5, 14), increasing the chloride conductance in nigral cells (92) and modifying their firing activity (17) and the dopamine release (42). In addition to this neurotransmitter pool, we have recently reported an extrasynaptic nigral pool of

taurine of glial origin (28, 73) whose physiological role is still being explored.

Taurine is one of the best-known osmolites. In different brain regions, taurine can be released by glial cells to prevent the damaging action of extracellular hypotonicity on cell volume (39, 63, 84). This osmosensitive taurine release (OTR) has been observed in cerebellar (7, 54), supraoptic (12, 13, 21, 36), cortical (63, 78), and hippocampal (15, 41, 50) cells. In this study, we evaluated osmoregulation as a possible function for the extrasynaptic nigral pool of taurine. Thus we evaluated the possible response of the extrasynaptic taurine pool to the osmolarity change in the SN using microdialysis methods. Several reports have suggested that, depending on the degree of swelling, cells may use different adaptation mechanisms (43, 44). Thus moderate (5% decrease) and substantial ($\geq 20\%$ decrease) modifications were made in microdialysis perfusate osmolarity to replicate the osmolarity changes observed under physiological and pathological conditions, respectively (53). Both ATP (9, 52, 74, 82) and glutamate (24, 30, 53, 89) are frequently involved in cellular osmoregulation, as their efflux is often integrated with the osmoregulatory response of taurine (4, 10, 28, 49, 67). Thus the possible influence of ATP and glutamate in nigral OTR was also tested. All studies were performed with microdialysis methods in an *in vivo* rat preparation. An osmosensitive response influenced by extracellular ATP and glutamate was observed in the extrasynaptic taurine pool. Bearing in mind the neuroprotective capability of taurine (19, 45, 79, 80, 88), the osmotic modulation of this taurine pool could be relevant for SN cell survival in PD (31, 86).

MATERIALS AND METHODS

Experiments were carried out on male Sprague-Dawley rats weighing 300–350 g. Animals were housed at 22°C, two per cage, under normal laboratory conditions on a standard light-dark schedule (12:12 h, with 0300 to 1500 lights on) and with free access to food and water. Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures, and adequate measures were taken to minimize pain and discomfort. Experimental protocols were reviewed and approved by the Ethical Committee for Research at La Laguna University.

Microdialysis. Microdialysis was used according to previously reported procedures (28, 73). Animals were anesthetized with equitensine (pentobarbital sodium 29 mg/kg, chloral hydrate 127.5 mg/kg, MgSO₄ 71.4 mg/kg, dihydroxypropane 40%, and ethanol 10%), an anesthetic that does not change the extracellular concentration of amino acids (75). To maintain a long-lasting, stable anesthesia,

Address for reprint requests and other correspondence: M. Rodríguez Díaz, Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain (e-mail: mrdiaz@ull.es).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

animals were continuously intraperitoneally (ip) perfused with equitensine (0.5 ml/h) beginning 60 min after the initial ip administration of the anesthetic. Body temperature was monitored and maintained between 36.5 and 37.0°C for the whole session. A concentric microdialysis probe (220- μ m diameter, 1-mm long, and in vitro recovery of \approx 15% for amino acids) was introduced in the SN (3.0 mm anterior to lambda, 2.0 mm lateral to the midline, and 8.0 mm under the cortical surface) and perfused with a Ringer solution (NaCl 148 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 1.2 mM, and MgCl₂ 0.8 mM) at a rate of 2.0 μ l/min. After samples from the first 150 min were discarded, dialysate fractions were collected at 10-min intervals. The dependence of extracellular taurine on osmolarity was studied by perfusing hypoosmolar or hyperosmolar solutions through the dialysis membrane during short time periods (pulses of 5 min). Two basal conditions were evaluated, one with a normal osmolarity (285 mosM) and the other with low osmolarity (230 mosM). The osmolarity of Ringer preparations was quantified with an osmometer (Osmostat OM-6020; CagaK, Kyoto, Japan). Ringer solutions were modified by progressively decreasing (to obtain Ringer solutions of 230, 180, 130, and 110 mosM) or increasing (to obtain solutions of 300 mosM) the NaCl concentration. To distinguish the possible influence of the Na⁺/Cl⁻ low concentration from the hypoosmolarity effects in hy-

poosmolar solutions, a 60 mM choline-Cl was occasionally added to the 180 mosM Ringer solution (91), which therefore had a low ionic concentration but an osmolarity similar to that of basal Ringer solutions (285 mosM).

The influence of ionotropic glutamate receptors on basal extrasynaptic taurine was studied by perfusing an α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA)-kainate receptor antagonist (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dionine disodium, CNQC; 500 μ M, Tocris) with reverse microdialysis. The influence of these receptors on the taurine response to hypoosmolarity was studied by comparing the taurine response to hypoosmolar pulses of 5 min (130 mosM vs. a basal osmolarity of 285 mosM) administered before and after pretreatment with CNQC (500 μ M perfused starting from 40 min before the second hypoosmolar pulse).

The influence of purinergic receptors on basal extrasynaptic taurine was studied by quantifying the taurine concentration before and after administration of a receptor agonist (adenosine 5'-triphosphate standard disodium salt hydrate, ATP; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) or a receptor antagonist (pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid, PPADS, which is a P2 receptor antagonist; 1 mM, Tocris) with reverse microdialysis. A concentration-response curve was drawn for ATP studies for 5-min pulses of ATP solutions (0.1, 1, 10, 50, and 250

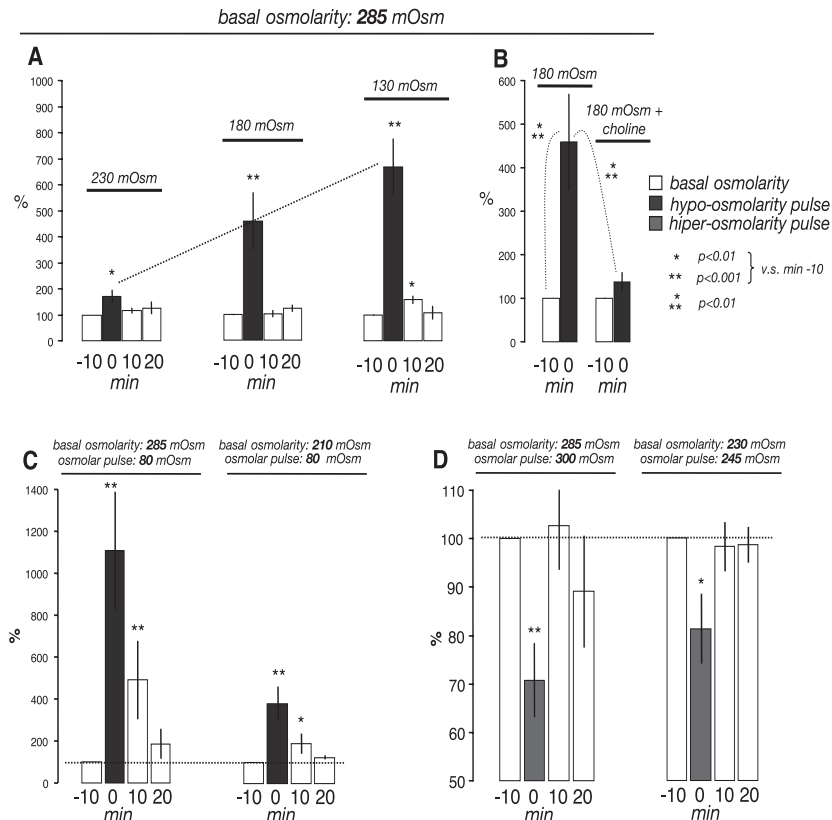


Fig. 1. Taurine and nigral cell adaptation to hypoosmotic conditions. *A*: dose-dependent increase (285–130 mosM) of extrasynaptic taurine during hypoosmotic Ringer perfusion. *B*: inhibition of taurine response by substituting the NaCl omitted in the perfusing solution with choline-Cl. *C*: taurine response to marked hypoosmolar pulses (80 mosM) after decreasing tonicity below a normal (285 mosM at left) and below a low osmolarity (210 mosM at right) basal Ringer solution. *D*: decrease of extrasynaptic taurine after increasing tonicity above a normal (285 mosM at left) and above a hypotonic (230 mosM at right) basal Ringer solution. Values are percentages of the basal levels 10 min before the hypoosmolar pulse administration (mean \pm SE).

mM in Ringer). The influence of purinergic receptors on the taurine response to hypoosmolarity was studied by comparing the taurine response to hypoosmolar pulses of 5 min (180 mosM vs. a basal osmolarity of 285 mosM) administered before (starting from 40 min before the second hypoosmolar pulse) and during PPADS (1 mM) or ATP (perfused in saturating concentrations of 100 μ M) administration.

Biochemical analyses. Taurine and glutamate were determined on a high-performance liquid chromatograph (HPLC) system with a 4- μ m C18 reverse-phase column (100 \times 4.6 mm) and fluorimetric detection. Precolumn derivatization was performed with *o*-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol-borate reagent (pH 10.4). Dialysate (10 μ l) was derivatized with the same volume of the *o*-phthalaldehyde reagent solution (P0532; Sigma, St. Louis, MO), and, after a 120-s reaction period (6°C in a 717plus autosampler; Waters), the reaction was stopped with 5 μ l of acetic acid (5%) and immediately injected into a HPLC. The mobile phase (pH 5.65) was composed of sodium acetate (0.05 M), methanol (5%), and isopropylol acid (1.36%) and flowed at 1.0 ml/min in a gradient (20-min duration) from 25 to 75% methanol (48). The fluorimetric detector (model no. 474; Waters) had the excitation wavelength set at 370 nm and the emission cut-off filter set at 450 nm. The recovery rate of the microdialysis probe was tested *in vitro* at the start of each experiment for the posterior calculation of the extracellular concentration of taurine.

Histology. At the end of each experiment, the rats were transcardially perfused with 200 ml of 0.9% saline solution followed by 400 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) to confirm the microdialysis probe placement. Brains were removed and stored in the same fixative at 4°C for 12–24 h, and then the midbrain was cut at 50 μ m with a vibratome in the coronal plane and stained with the formal thionine procedure.

Statistics. Mathematical analyses were performed using one-way ANOVA followed by the least significant difference test for post hoc comparisons. Analysis was performed using the Statistica program (Statsoft). A level of $P < 0.05$ was considered as critical for assigning statistical significance.

RESULTS

The extracellular taurine concentration observed here with microdialysis in the substantia nigra was $2.7 \pm 0.45 \mu$ M.

In the first experiment, a group of seven rats was administered with three successive pulses (5 min/pulse) of low osmolar

Ringer (Fig. 1A). Hypoosmolarity increased extrasynaptic taurine concentration in a dose-dependent way, inducing a 60% increase after the first pulse (230 mosM) and a 550% increase after the third pulse (130 mosM). Except for the highest stimulus (130 mosM), which showed a small taurine increase in the dialysate obtained 5–15 min after the hypoosmolar pulse switch-off, the taurine response was observed only in the dialysate obtained during stimulation, having completely disappeared 5 min after the stimulus switch-off.

In the second experiment, rats ($n = 6$) were administered with two successive hypoosmolar pulses: the first one was performed with a low NaCl concentration (88 mM) to obtain a osmolarity of 180 mosM, and the second one had the same low NaCl concentration, but its osmolarity was restored to that of normal Ringer (275 mosM) by adding choline-Cl (60 mM). The first pulse increased the taurine concentration, an effect that vanished when the hypoosmolarity was compensated with choline-Cl (Fig. 1B). This showed that the taurine increase induced by low osmolarity is a specific phenomenon not induced by the low concentration of sodium or chloride.

In the third experiment, two groups of rats (6 rats each) were administered with marked hypoosmolar pulses (80 mosM), but, whereas in the first one, the osmolarity of the Ringer solution perfused under basal conditions was in the physiological range (285 mosM), in the second one, it was clearly below the normal level (210 mosM). Taurine increased in both cases (Fig. 1C), but the response was higher in the group that started from a normal basal osmolarity (the difference between the basal and pulse osmolarity was a 200 mosM difference) than in the low osmolarity basal group (130 mosM difference). This showed that the taurine response to hypoosmolarity also remains active when the basal osmolarity is very low.

In the fourth experiment, the basal osmolarity of two rat groups (of 5 rats each) was slightly increased, but, whereas in the first one, the Ringer perfused under basal conditions was in the physiological range (285 mosM), in the second one, it was clearly below normal levels (245 mosM). In both cases, the osmolarity increase during the pulse was 15 mosM (from 285 to 300 mosM in the first case, and from 230 to 245 mosM in the

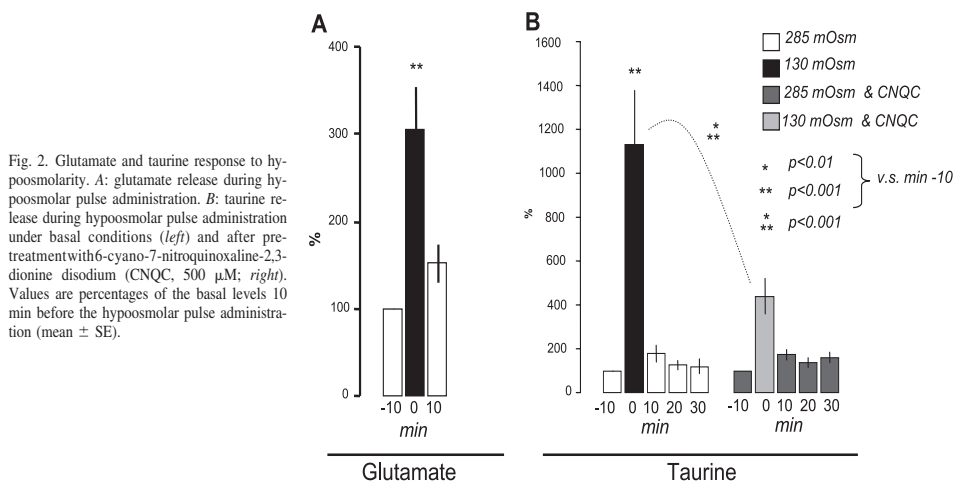


Fig. 2. Glutamate and taurine response to hypoosmolarity. **A:** glutamate release during hypoosmolar pulse administration. **B:** taurine release during hypoosmolar pulse administration under basal conditions (left) and after pretreatment with 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium (CNQC, 500 μ M; right). Values are percentages of the basal levels 10 min before the hypoosmolar pulse administration (mean \pm SE).

second one). The hyperosmolar pulse decreased the extracellular taurine to ~70–80% of its basal level in both groups (Fig. 1D), suggesting that taurine also responds to osmolarity increases, even when they are small increases around normal osmolarity levels.

The fifth experiment showed an osmosensitive response for nigral extrasynaptic glutamate. A 300% increase of extrasynaptic glutamate (Fig. 2A) was observed ($n = 6$) during the administration of hypoosmotic pulses (130 mosM vs. a basal osmolarity of 285 mosM). In addition, the AMPA-kainite glutamate receptor blockade with CNQC ($n = 9$) decreased the taurine response (Fig. 2B) to hypoosmolarity pulses (130 vs. 285 mosM). These data suggest that hypoosmolarity facilitates glutamate release, which, acting on ionotropic glutamate receptors, increases the taurine osmoregulatory response.

The aim of the following experiments was to study the possible involvement of purinergic receptors on the taurine response to hypoosmolarity. Initially, we observed ($n = 8$) a

dose-dependent increase of extracellular taurine in response to ATP-enriched Ringer solutions (Fig. 3A). Thus the amplitude of taurine response was higher when the ATP concentration was increased from 0.1 to 10 μM . Although no further increases were observed for ATP stimuli $>10 \mu\text{M}$ (350% increase), the response duration persisted for longer time periods when the ATP concentration of stimulatory pulses was increased (10 min for 1 μM ATP, 20 min for 10 μM ATP, >40 min for 50–250 μM ATP). When a persistent ATP administration ($n = 5$) was performed (instead of the short-lasting stimulus previously used), a stable taurine increase was observed (Fig. 3B). In addition, ATP (100 μM) decreased the taurine response to hypoosmolarity [Fig. 3C shows the response to 180 mosM vs. (basal) 285 mosM when osmolar pulses were produced before and during ATP perfusion].

The possible ATP action on taurinergic response to hypoosmolarity was also supported by experiments with PPADS, a purinergic receptor antagonist. PPADS decreased ($n = 6$)

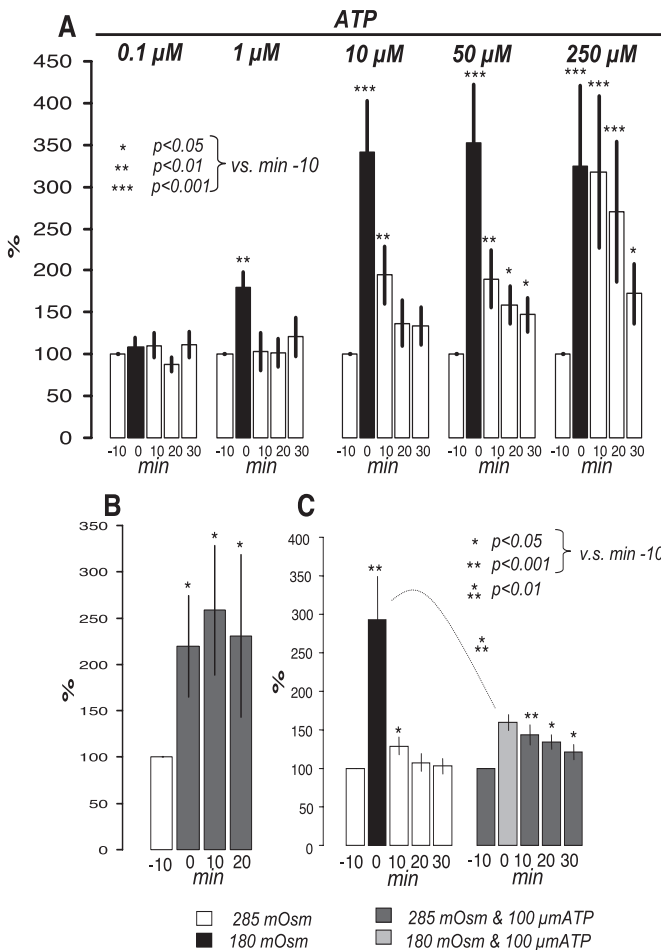


Fig. 3. ATP and taurine response to hypoosmolarity. **A**: taurine response to increasing ATP pulses (0.1–250 μM during 5 min). **B**: taurine release during the continuous perfusion of 100 μM ATP. **C**: taurine release during hypoosmolar pulse administration under basal conditions (*left*) and after pretreatment with 100 μM ATP (*right*). Values are percentage of the basal levels 10 min before ATP or hypoosmolar pulse administration (mean \pm SE).

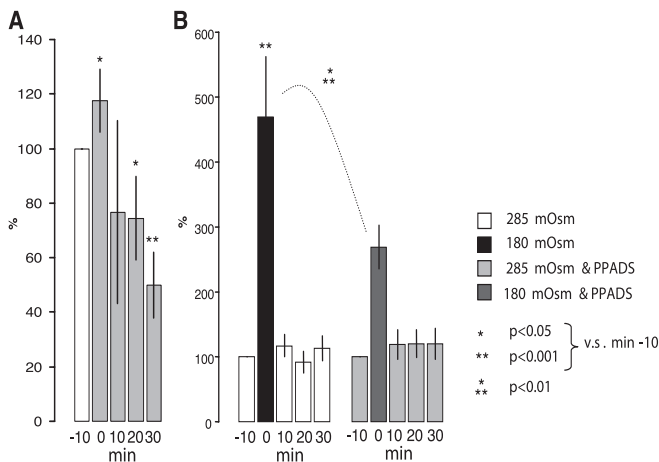


Fig. 4. ATP receptor and taurine response to hypoosmolarity. *A*: taurine release during the continuous perfusion of 1 mM pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS). *B*: taurine release during hypoosmolar pulse administration under basal conditions (*left*) and after pretreatment with 1 mM PPADS (*right*). Values are percentages of the basal levels 10 min before PPADS or hypoosmolar pulse administration (mean \pm SE).

extrasynaptic taurine (Fig. 4A), suggesting that, under basal conditions of osmolarity, purinergic receptors facilitate taurine release. In addition, PPADS ($n = 7$) decreased the taurine response to hypoosmolarity [Fig. 4B shows the response to 180 mosM vs. (basal) 285 mosM when osmolar pulses were produced before and during PPADS perfusion], data suggesting that the taurine osmoregulatory response is facilitated by the purinergic receptor activation.

DISCUSSION

The present data show a sensitive and proportional response of the extrasynaptic pool of taurine to the extracellular osmolarity in the SN, a response facilitated by ATP and glutamate release. These data are the first evidence suggesting an osmoregulatory role for taurine in the SN, a center where its only known function is inhibitory neurotransmission. Bearing in mind the recently reported relevance of inflammation in the SN cell degeneration that characterizes Parkinson's disease, the osmoregulatory response of taurine reported here suggests that this amino acid is a new variable to be included in the multifactorial puzzle that is now being composed to explain the initiation and evolution of this illness.

The main finding of this study was the dose-dependent increase of extrasynaptic taurine as a result of the perfusion of hypoosmolar solutions (OTR). Although these solutions contained low concentrations of NaCl, the taurine response was not the consequence of the low sodium and chloride levels, as shown by the fact that the taurine response to low ionic solutions disappeared when hypoosmolarity was compensated with choline. The opposite effect (taurine decrease) was observed after increasing the osmolarity in the perfusing solutions. The OTR is probably present under both physiological (as suggested by the modifications observed after osmolarity changes of <5%) and pathological (as suggested by the modifications observed after 20–70% osmolarity changes) conditions. Previous studies have reported a taurine release by striatonigral neurons (5, 14), which, acting on glycine receptors (16, 32, 46), modify the chloride conductance (92), the firing activity of SN cells (17), and motor behavior (69). In addition

to this neurotransmitter pool, we recently reported a nonsynaptic pool of taurine in the nigra that changed after modifying the glial cell metabolism with fluorocitrate and L-methionine sulfoximide (28). Present data suggest the nigral cell osmoregulation as a function of this extrasynaptic taurine pool (microdialysis is a suitable method for studying extrasynaptic substances that diffuse across the extracellular space but not for studying neurotransmitters that are released and taken up in the synaptic cleft) (11, 35, 87). Thus taurine may have two different functions in the SN, the previously reported function as inhibitory neurotransmitter and the function as extrasynaptic osmotic regulator suggested here.

Although taurine is one of the most studied osmolytes, the molecular identity of the membrane permeability pathways used by taurine to leave the cells during the osmotic response is not fully known. Some of mechanisms proposed for taurine outflow are nonselective (e.g., swelling-activated anion channels and hemichannels of gap junctions) (3, 20, 22, 39, 40, 93), thus explaining the fact that taurine release is normally accompanied by the release of other osmolytes (25, 53, 68, 74, 81). This is the case for glutamate and ATP, two substances that, with low molecular masses and high cytosolic concentrations, can cross the cell membrane by some of the pathways proposed for taurine outflow (e.g., cytosolic molecules of <1 kDa can cross hemichannels) (40, 93). The present finding showing a collateral release of glutamate (and presumably of ATP) accompanying nigral OTR suggests that, in a similar way to what is observed in other cells, taurine response to osmolarity involves nonselective membrane pathways in the SN as well.

Taurine response decreased both after PPADS administration and under the action of saturating concentrations of ATP. This, together with the fact that extracellular taurine increased after ATP administration, suggests that a portion of OTR was activated by the osmotic stimulation of ATP release. Previous studies in other cells have reported a two-step osmosensitive release of ATP, an initial release directly associated with hypoosmolarity (perhaps across the swelling-activated anion channels) (6, 33, 34) followed by an autocrine activation of purinergic receptors (9, 52, 74, 82), which, after forming large

membrane channels, enhances and prolongs the ATP release (56). Because these channels are permeable to molecules up to 900 Da (56), their opening by ATP facilitates the taurine efflux (4, 67). In addition, the purinergic receptor stimulation can open swelling-activated anion channels (10), which could be an additional mechanism for ATP action on taurine release (4, 67). The self-sustained feedback response to ATP could be at the basis of the persistent taurine release observed here after both the administration of the highest ATP doses (which did not induce a supplementary increase of extracellular taurine but prolonged the time of taurine response) and the administration of hypoosmolar solutions under ATP receptor saturation conditions (after high ATP doses). Thus present data suggest that a portion of nigral OTR involves purinergic receptors. The decreased basal taurine observed after PPADS administration suggests that ATP modulation of taurine release is active under basal conditions (and not only under hypoosmotic conditions), pointing to P2 (highly expressed in the SN) (38) as being the purinergic receptors involved in this ATP action.

Different data also suggested the involvement of glutamate in OTR. In agreement with previous *in vitro* studies (25, 68, 81), here glutamate increased under hypoosmolar conditions. The mechanisms for osmosensitive glutamate release are not well known, but, bearing in mind the high cytosolic concentration of glutamate (mM in the cytosol vs. μ M in the extracellular space) (55, 85), the osmoregulatory opening of non-selective membrane pathways, and the previously reported ATP-glutamate co-release (90), it is possible that the glutamate response to osmolarity is a two-step process: the first step is performed by the same nonspecific membrane pathways used for ATP response, and the second step is feedback facilitated by the initial ATP release (18, 23, 26, 27, 71). The glial transporters are very efficient in preventing the glutamate flow across the extracellular medium and its diffusion to the microdialysis probe (61, 62). Thus the glutamate increase observed here suggests that hypoosmolarity induces a large enough glutamate release to saturate the glutamate transporters. In addition, we observed a reduction of OTR after the AMPA-kainite receptor blockade with CNQC. This, together with previous evidence showing an increase of taurine release after glutamate and AMPA administration (28), suggests that the glutamate release induced by hypoosmolarity facilitates OTR.

Recent evidence shows inflammation as a critical factor for SN cell degeneration in PD (31, 86). Although the intracellular/extracellular exchange of low molecular mass solutes is the most common and efficient adaptation to swelling, massive efflux of some molecules can damage both the osmolyte releasing cells (i.e., the loss of ATP can cause a lack of energy) and their neighboring cells (i.e., the release of glutamate can cause excitotoxicity). This could be especially dangerous for nigral dopaminergic neurons, which are particularly vulnerable to energetic imbalance (8, 77) and to the toxic action of glutamate (57, 60, 64). In this context, the extrasynaptic taurine pool could be particularly suitable for regulating SN cell osmolarity without inducing the collateral effects of other osmolytes. Taurine meets the requirements for a biologically ideal osmoregulator with high water solubility and low lipophilicity (which facilitates a high concentration gradient across cell membranes), a capability of flowing efficiently through membrane channels when needed, and no metabolic functions (greatest proportion of taurine is excreted in an unchanged

form and is often considered an inert waste product of the sulfur metabolism) (37). Taurine release directly modulated by osmolarity or indirectly modulated by other osmolytes such as ATP or glutamate could perform a key function for dopamine cell survival under unfavorable conditions such as those present in the SN during PD evolution (58, 59).

GRANTS

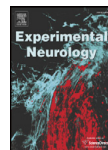
This work was supported by Plan National I+D+I del Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ciberméd and Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias, Spain.

REFERENCES

- Allen IC, Grievae A, Griffiths R. Differential changes in the content of amino acid neurotransmitters in discrete regions of the rat brain prior to the onset and during the course of homocysteine-induced seizures. *J Neurochem* 46: 1582–1592, 1986.
- Ball EF, Shaw PJ, Ince PG, Johnson M. The distribution of excitatory amino acid receptors in the normal human midbrain and basal ganglia with implications for Parkinson's disease: a quantitative autoradiographic study using [3 H]MK-801, [3 H]glycine, [3 H]CNQX and [3 H]kainate. *Brain Res* 658: 209–218, 1994.
- Barakat L, Wang D, Borday A. Carrier-mediated uptake and release of taurine from Bergmann glia in rat cerebellar slices. *J Physiol* 541: 753–767, 2002.
- Basarsky TA, Feighan D, MacVicar BA. Glutamate release through volume-activated channels during spreading depression. *J Neurosci* 19: 6439–6445, 1999.
- Bianchi L, Colivicchi MA, Bolam JP, Della Corte L. The release of amino acids from rat neostriatum and substantia nigra *in vivo*: a dual microdialysis probe analysis. *Neuroscience* 87: 171–180, 1998.
- Bond TD, Ambikopathy S, Mohammad S, Valverde MA. Osmosensitive Cl^- currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *J Physiol* 511: 45–54, 1998.
- Cardin V, Lezama R, Torres-Marquez ME, Pasantes-Morales H. Potentiation of the osmosensitive taurine release and cell volume regulation by cytosolic Ca^{2+} rise in cultured cerebellar astrocytes. *Glia* 44: 119–128, 2003.
- Cooper JA, Sagar HJ, Jordan N, Harvey NS, Sullivan EV. Cognitive impairment in early, untreated Parkinson's disease and its relationship to motor disability. *Brain* 114: 2095–2122, 1991.
- Chen Q, Moulder K, Tenkova T, Hardy K, Olney JW, Romano C. Excitotoxic cell death dependent on inhibitory receptor activation. *Exp Neurol* 160: 215–225, 1999.
- Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol* 89: 1870–1877, 2003.
- Del Arco A, Segovia G, Fuxe K, Mora F. Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem* 85: 23–33, 2003.
- Deleuze C, Duvoird A, Hussy N. Properties and glial origin of osmotic-dependent release of taurine from the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 507: 463–471, 1998.
- Deleuze C, Duvoird A, Moos FC, Hussy N. Tyrosine phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 523: 291–299, 2000.
- Della Corte L, Bolam JP, Clarke DJ, Parry DM, Smith AD. Sites of [3 H]taurine uptake in the rat substantia nigra in relation to the release of taurine from the striatonigral pathway. *Eur J Neurosci* 2: 50–61, 1990.
- del Olmo N, Galarreta M, Bustamante J, Martín del Río R, Solís JM. Taurine-induced synaptic potentiation: role of calcium and interaction with LTP. *Neuropharmacology* 39: 40–54, 2000.
- Dopico JG, Gonzalez-Hernandez T, Perez IM, Garcia IG, Abril AM, Inchausti JO, Rodriguez Diaz M. Glycine release in the substantia nigra: interaction with glutamate and GABA. *Neuropharmacology* 50: 548–557, 2006.
- Dray A, Gonye TJ, Oakley NR. Caudate stimulation and substantia nigra activity in the rat. *J Physiol* 259: 825–849, 1976.
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23: 1320–1328, 2003.

19. El Idrissi A, Trenkner E. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J Neurosci* 19: 9459–9468, 1999.
20. El-Sherbany A, Naggar H, Miyauchi S, Ola MS, Maddox DM, Martin PM, Ganapathy V, Smith SB. Osmoregulation of taurine transporter function and expression in retinal pigment epithelial, ganglion, and muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 694–701, 2004.
21. Engelmann M, Ludwig M, Singewald N, Ebner K, Sabatier N, Lubec G, Landgraf R, Wotjak CT. Taurine selectively modulates the secretory activity of vasopressin neurons in conscious rats. *Eur J Neurosci* 14: 1047–1055, 2001.
22. Evanko DS, Zhang Q, Zorec R, Haydon PG. Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia* 47: 233–240, 2004.
23. Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol Chem* 279: 4274–4284, 2004.
24. Franco R, Quesada O, Pasantes-Morales H. Efflux of osmolyte amino acids during isovolumic regulation in hippocampal slices. *J Neurosci Res* 61: 701–711, 2000.
25. Franco R, Torres-Marquez ME, Pasantes-Morales H. Evidence for two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices. *Pflügers Arch* 442: 791–800, 2001.
26. Franke H, Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther* 109: 297–324, 2006.
27. Franke H, Krugel U, Illes P. P2 receptors and neuronal injury. *Pflügers Arch* 452: 622–644, 2006.
28. Garcia Dopico J, Perdomo Diaz J, Alonso TJ, Gonzalez Hernandez T, Castro Fuentes R, Rodriguez Diaz M. Extracellular taurine in the substantia nigra: taurine-glutamate interaction. *J Neurosci Res* 76: 528–538, 2004.
29. Gonzalez-Hernandez T, Rodriguez M. Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol* 421: 107–135, 2000.
30. Goude R, Renaud S, Bonnassie S, Bernard T, Blanco C. Glutamine, glutamate, and alpha-glucosylglycerate are the major osmolyte solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Appl Environ Microbiol* 70: 6535–6541, 2004.
31. Hartmann A, Hunot S, Hirsch EC. Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. *Exp Neurol* 184: 561–564, 2003.
32. Hausser MA, Yung WH, Lacey MG. Taurine and glycine activate the same Cl⁻ conductance in substantia nigra dopamine neurons. *Brain Res* 571: 103–108, 1992.
33. Hendil KB, Hoffmann EK. Cell volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *J Cell Physiol* 84: 115–125, 1974.
34. Hermoso M, Satterwhite CM, Andrade YN, Hidalgo J, Wilson SM, Horowitz B, Hume JR. CIC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl⁻ channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 277: 40066–40074, 2002.
35. Herrera-Marschitz M, You ZB, Gojny M, Meana JJ, Silveira R, Godukhin OV, Chen Y, Espinoza S, Petterson E, Loidl CF, Lubec G, Andersson K, Nylander I, Terenius L, Ungerstedt U. On the origin of extracellular glutamate levels monitored in the basal ganglia of the rat by in vivo microdialysis. *J Neurochem* 66: 1726–1735, 1996.
36. Hussy N, Deleuze C, Bres V, Moos FC. New role of taurine as an osmomediator between glial cells and neurons in the rat supraoptic nucleus. *Adv Exp Med Biol* 483: 227–237, 2000.
37. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72: 101–163, 1992.
38. Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF. Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 407: 11–32, 1999.
39. Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10: 1583–1591, 1990.
40. Laird DW. The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J Bioenerg Biomembr* 28: 311–318, 1996.
41. Lehmann A. Effects of microdialysis-perfusion with anisosmotic media on extracellular amino acids in the rat hippocampus and skeletal muscle. *J Neurochem* 53: 525–535, 1989.
42. Leviev V, Cheramy A, Nicoullon A, Glowinski J. Symmetric bilateral changes in dopamine release from the caudate nuclei of the cat induced by unilateral nigral application of glycine and GABA-related compounds. *Brain Res* 175: 259–270, 1979.
43. MacLeod RJ, Hamilton JR. Ca(2+)/Calmodulin kinase II and decreases in intracellular pH are required to activate K(+) channels after substantial swelling in villus epithelial cells. *J Membr Biol* 172: 59–66, 1999.
44. MacLeod RJ, Hamilton JR. Increases in intracellular pH and Ca(2+) are essential for K(+) channel activation after modest 'physiological' swelling in villus epithelial cells. *J Membr Biol* 172: 47–58, 1999.
45. Malcangio M, Bartolini A, Ghelardini C, Bennardini F, Malmberg-Aiello P, Francini F, Giotti A. Effect of ICV taurine on the impairment of learning, convulsions and death caused by hypoxia. *Psychopharmacology (Berl)* 98: 316–320, 1989.
46. Mangin JM, Guyon A, Eugene D, Paupardin-Tritsch D, Legendre P. Functional glycine receptor maturation in the absence of glycinergic input in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. *J Physiol* 542: 685–697, 2002.
47. Martinez-Murillo R, Villalba R, Montero-Caballero MI, Rodrigo J. Cholinergic somata and terminals in the rat substantia nigra: an immunocytochemical study with optical and electron microscopic techniques. *J Comp Neurol* 281: 397–415, 1989.
48. Massieu L, Tapia R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem* 69: 1151–1160, 1997.
49. Menendez N, Herreras O, Solis JM, Herranz AS, Martin del Rio R. Extracellular taurine increase in rat hippocampus evoked by specific glutamate receptor activation is related to the excitatory potency of glutamate agonists. *Neurosci Lett* 102: 64–69, 1989.
50. Menendez N, Solis JM, Herreras O, Sanchez Herranz A, Martin del Rio R. Role of endogenous taurine on the glutamate analogue-induced neurotoxicity in the rat hippocampus in vivo. *J Neurochem* 55: 714–717, 1990.
51. Mercuri NB, Calabresi P, Bernardi G. Potassium ions play a role in the glycine-induced inhibition of rat substantia nigra zona compacta neurones. *Brain Res* 462: 199–203, 1988.
52. Mitchell CH, Carre DA, McGlinn AM, Stone RA, Civan MM. A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7174–7178, 1998.
53. Mongin AA, Kimelberg HK. ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca²⁺-sensitive mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C204–C213, 2005.
54. Moran J, Morales-Mulia S, Hernandez-Cruz A, Pasantes-Morales H. Regulatory volume decrease and associated osmolyte fluxes in cerebellar granule neurons are calcium independent. *J Neurosci Res* 47: 144–154, 1997.
55. Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3: 748–755, 2002.
56. North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 563–580, 2000.
57. Obeso JA, Rodriguez-Oroz M, Marin C, Alonso F, Zamarbide I, Lanciego JL, Rodriguez-Diaz M. The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. *Neurology* 62: S17–S30, 2004.
58. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Chana P, Lera G, Rodriguez M, Olanow CW. The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease. *Neurology* 55: S13–S20; discussion S21–S13, 2000.
59. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Arbizu J, Gimenez-Amaya JM. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci* 17: 51–55, 2002.
60. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23: S8–S19, 2000.
61. Obrenovitch TP, Urenjak J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog Neurobiol* 51: 39–87, 1997.
62. Obrenovitch TP, Urenjak J, Zilkha E. Intracellular microdialysis combined with recording of extracellular field potential: a novel method for investigation of depolarizing drugs in vivo. *Br J Pharmacol* 113: 1295–1302, 1994.
63. O'Connor ER, Kimelberg HK. Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J Neurosci* 13: 2638–2650, 1993.
64. Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 22: 123–144, 1999.

65. Palkovits M, Elekes I, Lang T, Patthy A. Taurine levels in discrete brain nuclei of rats. *J Neurochem* 47: 1333–1335, 1986.
66. Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 91–127, 1995.
67. Pasantes-Morales H, Cruz C. Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments. *J Neurosci Res* 11: 303–311, 1984.
68. Pasantes-Morales H, Franco R, Ordaz B, Ochoa LD. Mechanisms counteracting swelling in brain cells during hyponatremia. *Arch Med Res* 33: 237–244, 2002.
69. Pycock CJ. Turning behaviour in animals. *Neuroscience* 5: 461–514, 1980.
70. Redgrave P, Marrow L, Dean P. Topographical organization of the nigroreticular projection in rat: evidence for segregated channels. *Neuroscience* 50: 571–595, 1992.
71. Rodrigues RJ, Almeida T, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci* 25: 6286–6295, 2005.
72. Rodriguez M, Castellano MA, Palarea MD. Interhemispheric regulation of dopaminergic ascending systems. *Life Sci* 47: 377–384, 1990.
73. Rodriguez Diaz M, Alonso TJ, Perdomo Diaz J, Gonzalez Hernandez T, Castro Fuentes R, Sabate M, Garcia Dopico J. Glial regulation of nonsynaptic extracellular glutamate in the substantia nigra. *Glia* 49: 134–142, 2005.
74. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knock-out of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675–686, 1996.
75. Rozza A, Masoero E, Favalli L, Lanza E, Govoni S, Rizzo V, Montalbetti L. Influence of different anaesthetics on extracellular aminoacids in rat brain. *J Neurosci Methods* 101: 165–169, 2000.
76. Sato K, Zhang JH, Saika T, Sato M, Tada K, Tohyama M. Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: an analysis using in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 43: 381–395, 1991.
77. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54: 823–827, 1990.
78. Schousboe A, Pasantes-Morales H. Potassium-stimulated release of [³H]taurine from cultured GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurochem* 53: 1309–1315, 1989.
79. Schurr A, Rigor BM. The mechanism of neuronal resistance and adaptation to hypoxia. *FEBS Lett* 224: 4–8, 1987.
80. Schurr A, Tseng MT, West CA, Rigor BM. Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an in vitro study. *Life Sci* 40: 2059–2066, 1987.
81. Schwartzkroin PA, Baraban SC, Hochman DW. Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability. *Epilepsy Res* 32: 275–285, 1998.
82. Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81: 1063–1073, 1995.
83. Smith AD, Bolam JP. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13: 259–265, 1990.
84. Stutzin A, Torres R, Oporto M, Pacheco P, Eguiguren AL, Cid LP, Sepulveda FV. Separate taurine and chloride efflux pathways activated during regulatory volume decrease. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C392–C402, 1999.
85. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276: 1699–1702, 1997.
86. Teismann P, Schulz JB. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res* 318: 149–161, 2004.
87. Timmerman W, Westerink BH. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* 27: 242–261, 1997.
88. Trenkner E. Possible role of glutamate with taurine in neuron-glia interaction during cerebellar development. *Prog Clin Biol Res* 351: 133–140, 1990.
89. Tuz K, Ordaz B, Vaca L, Quesada O, Pasantes-Morales H. Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 79: 143–151, 2001.
90. Wieraszko A, Goldsmith G, Seyfried TN. Stimulation-dependent release of adenosine triphosphate from hippocampal slices. *Brain Res* 485: 244–250, 1989.
91. Wilson AA, Johnson DP, Mozley D, Hussey D, Ginovart N, Nobrega J, Garcia A, Meyer J, Houle S. Synthesis and in vivo evaluation of novel radiotracers for the in vivo imaging of the norepinephrine transporter. *Nucl Med Biol* 30: 85–92, 2003.
92. Ye G, Tse AC, Yung W. Taurine inhibits rat substantia nigra pars reticulata neurons by activation of GABA- and glycine-linked chloride conductance. *Brain Res* 749: 175–179, 1997.
93. Yeager M, Nicholson BJ. Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 6: 183–192, 1996.



Osmosensitive response of glutamate in the substantia nigra

Ingrid Moráles^{a,c}, Angel Fuentes^a, Tomas Gonzalez-Hernandez^{b,c}, Manuel Rodríguez^{a,c,*}

^a Laboratory of Neurobiology and Experimental Neurology, Department of Physiology Faculty of Medicine, University of La Laguna, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

^b Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of La Laguna, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2009

Revised 9 September 2009

Accepted 11 September 2009

Available online 18 September 2009

Keywords:

Glutamate

ATP

Substantia nigra

Osmoregulation

Swelling

Parkinson's disease

ABSTRACT

Previous studies have suggested the increase of extracellular glutamate (GLU) in the substantia nigra (SN) as a cause of dopamine-cell degeneration (excitotoxicity) in Parkinson's disease (PD). However, the mechanisms involved in this increase remain unknown. The present work studied osmoregulation as a cause of GLU release in the SN. Microdialysis was used to change extracellular osmolarity, to administer drugs and to quantify the extracellular non-synaptic GLU (EnS-GLU). Two osmolarity modifications were performed, a moderate decrease (5%) resembling physiological modifications and a substantial decrease ($\geq 20\%$ decrease) similar to that observed under pathological conditions. Hypo-osmolarity induced a dose-response (285–80 mOsm) increase of EnS-GLU which was detected after small osmolarity modifications (15 mOsm) and which was very marked ($>1000\%$) after more intense osmolarity changes. This response disappeared after pre-treating rats with a P2 purinergic-receptor antagonist (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid; 1 mM) suggesting ATP involvement in the osmosensitive EnS-GLU response. The EnS-GLU increase observed after administration of ATP (0.1–100 μ M) and 2-methylthioadenosine triphosphate tetrasodium (P2-receptor agonist; 100 μ M) and the lack of effects of adenosine administration (1 mM) suggest that the ATP action on P2 receptors is an amplifying mechanism in the osmosensitive EnS-GLU response. The marked action of osmolarity on extracellular GLU suggests osmolarity regulation as a possible source for excitotoxicity in the SN.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The degeneration of dopaminergic cells (DA cell) of the substantia nigra (SN) is considered as the hallmark of Parkinson's disease (PD). Although the cause for this degeneration remains unknown, its has been associated with an excess of extracellular glutamate in the SN (During et al., 1995; Marti et al., 2000; Meshul et al., 1999; Obrenovitch and Richards, 1995; Jenner and Olanow, 1998; Olanow and Tatton, 1999; Rodriguez-Oroz et al., 2001). There are no GLU neurons in the SN (Gonzalez-Hernandez and Rodriguez, 2000; Parent and Hazrati, 1995a; Rodriguez Diaz et al., 2005), and the excitotoxic action of nigral GLU on DA cells has been related to an increased activity of SN GLU inputs coming from the subthalamic nucleus and other brain centres (Di Loreto et al., 1992; Iribe et al., 1999; Lavoie and Parent, 1994; Nauta and Cole, 1978; Nijijima and Yoshida, 1988; Parent and Hazrati, 1995b; Rinvik and Ottersen, 1993; Scarnati et al., 1986). These neurons increase their firing rate in PD (Rodriguez and Gonzalez-Hernandez, 1999; DeLong, 1990; Obeso et al., 2000; Rodriguez-Oroz et al., 2001), but the high efficiency of glial GLU transporters surrounding the GLU synapse probably prevents the increase of extracellular GLU

that should be induced by neuronal hyperactivity (Barbour and Hauser, 1997; Scanziani, 2002). Thus, the etio-pathological role of GLU on PD has been questioned (Obrenovitch and Urenjak, 1997). We have reported an extracellular non-synaptic GLU (EnS-GLU) pool in the nigra of glial origin (Rodriguez et al., 1998). Astrocyte release GLU outside the synaptic cleft (Araque et al., 1999; Araque et al., 2000; Jabaudon et al., 1999; Pasti et al., 1997) which, after diffusing across the extracellular milieu, can induce persistent effects (seconds or minutes) (During et al., 1995; Marti et al., 2000; Meshul et al., 1999; Obrenovitch and Richards, 1995) on cells located far from the position where it was released (Agnati et al., 1995a,b; Zoll et al., 1998). Mechanisms involved in the regulation of the EnS-GLU and its possible excitotoxic action on PD remain unknown.

Glial cells are critical for the osmolarity regulation in the brain, a function performed by modulating the extracellular concentration of different substances (Franco et al., 2000; Goude et al., 2004; Mongin and Kimelberg, 2005; Morales et al., 2007; Tuz et al., 2001). The aim of the present paper was to study the influence of extracellular osmolarity on the EnS-GLU pool in the SN. Microdialysis was used to induce local changes in the extracellular osmolarity (by changing the osmolarity of the perfusing solutions), to administer drugs (reverse dialysis) and to quantify the extrasynaptic GLU (direct dialysis). Because the adaptation mechanism changes with the swelling degree (MacLeod and Hamilton, 1999a,b), two osmolarity

* Corresponding author. Díaz, Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain. Fax: +34 22 319397.

E-mail address: mrdiaz@ull.es (M. Rodríguez).

modifications were performed, a moderate modification (5% decrease) which resembles changes observed under physiological conditions and a substantial modification ($\geq 20\%$ decrease) which resembles changes observed under pathological conditions (Mongin and Kimmelberg, 2005). There is evidence suggesting that local ATP concentration can modulate the glial release of GLU (Franke and Illes, 2006; Franke et al., 2006; Mongin and Kimmelberg, 2005). Thus, the possible involvement of ATP on the osmosensitive reaction of EnS-GLU was also evaluated.

Materials and methods

Experiments were carried out on male Sprague–Dawley rats weighing 300–350 g. Animals were housed at 22 °C, two per cage, under normal laboratory conditions on a standard light–dark schedule (12:12 h, lights on at 0300–1500 h) and free access to food and water. Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures, and adequate measures were taken to minimize pain and discomfort.

Microdialysis

Microdialysis was performed according to previously reported procedures (García Dopico et al., 2004; Rodríguez et al., 1998). Animals were anaesthetised with equitensine (pentobarbital 29 mg/kg, chloral hydrate 127.5 mg/kg, MgSO₄ 71.4 mg/kg, dihydroxypropane 40% and ethanol 10%). In order to maintain a long-lasting stable anaesthesia, animals were continuously ip perfused with equitensine (0.5 ml/h) beginning 60 min after the initial ip administration of the anaesthetic. Body temperature was monitored and maintained between 36.5 and 37.0 °C for the whole session. A concentric microdialysis probe (220 μ m diameter, 1 mm long and in vitro recovery of $\approx 15\%$ for amino acids) was introduced in the SN (3.0 mm anterior to lambda, 2.0 mm lateral to the midline and 8.0 mm under the cortical surface) and perfused with a ringer solution (NaCl 148 mM; KCl 2.7 mM; CaCl₂ 1.2 mM; and MgCl₂ 0.8 mM) at a rate of 2.0 μ l/min. After discarding samples from the first 150 min, dialysate fractions were collected at 10-min intervals. The dependence of extracellular GLU on osmolarity was studied by perfusing hypo-osmolar solutions through the dialysis membrane for short time periods (pulses of 5 min). The osmolarity of ringer preparations was quantified with an auto-osmometer (Osmostat OM-6020; CagaK Co. Ltd., Kyoto, Japan). The basal ringer (285 mOsm) was modified by progressively decreasing the NaCl concentration in order to obtain ringer solutions of 270, 230, 180, 130 and 80 mOsm.

The influence of purinergic receptors on the EnS-GLU pool was studied by quantifying the Glu concentration before and after the administration of P1-receptor agonist (adenosine; Sigma-Aldrich, Madrid), two P2-receptor agonists (adenosine 5'-triphosphate standard disodium salt hydrate [ATP], Sigma-Aldrich, Madrid; and 2-methylthioadenosine triphosphate tetrasodium [2Me-SATP], TOCRIS, UK) and a P2-receptor antagonist (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid [PPADS]; TOCRIS, UK). A dose–response curve was made for 5-min ATP pulses (0.1, 1, 10, 50 and 250 mM ATP in ringer). The influence of nucleotide receptors on Glu response to hypo-osmolarity was studied by comparing the Glu response to a 5-min hypo-osmolar pulse (180 mOsm vs. a basal osmolarity of 285 mOsm) administered before (starting from 40 min before the second hypo-osmolar pulse) and during PPADS (1 mM).

The influence of ionotropic glutamate receptors on basal extraneuronic Glu was studied by perfusing an AMPA-kainate receptor antagonist (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dionine disodium [CNQC], 500 μ M; TOCRIS, UK) with reverse microdialysis. The influence of these receptors on Glu response to hypo-osmolarity was studied by comparing the Glu response to 5-min hypo-osmolar

pulses (130 mOsm vs. a basal osmolarity of 285 mOsm) administered before and after pre-treatment with CNQC (500 μ M perfused starting from 40 min before the second hypo-osmolar pulse).

Biochemical analyses

Glutamate was determined on a high-performance liquid chromatograph (HPLC) system (4 μ m C18 reverse-phase column 100 \times 4.6 mm) and by fluorimetric detection. Pre-column derivatization was performed with *o*-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol/borate reagent (pH 10.4). Dialysate (10 μ l) was derivatized with the same volume of the *o*-phthalaldehyde reagent solution (P0532 of SIGMA, Saint Louis), and after a 120-s reaction period (6 °C in a 717plus autosampler; Waters, Milford, USA), the reaction was stopped with 5 μ l acetic acid (5%) and immediately injected into an HPLC. The mobile phase (pH 5.65) was composed of sodium acetate (0.05 M), methanol (5%) and isopropyl alcohol (1.36%) and flowed at 1.0 ml/min in a gradient (20 min duration) from 25% to 75% methanol (Rodríguez et al., 1998). The excitation wavelength of the fluorimetric detector (Model 474; Waters, Milford, USA) was set at 370 nm and the emission cutoff filter was set at 450 nm. The recovery rate of the microdialysis probe was tested *in vitro* at the beginning of each experiment for the posterior calculation of the extracellular concentration of glutamate.

Histology

At the end of each experiment, the rats were transcardially perfused with 200 ml of 0.9% saline solution followed by 400 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) to confirm the microdialysis probe placement. Brains were removed and stored in the same fixative at 4 °C for 12–24 h and then the midbrain was cut at 50 μ m with a vibratome in the coronal plane and stained with the formal thionine procedure.

Statistics

Mathematical analyses were performed using the one-way ANOVA followed by the LSD test for post hoc comparisons. Analysis was performed using the Statistic program (Statsoft; Tulsa, USA). A level of $p < 0.05$ was considered as critical for assigning statistical significance.

Results

The nigral EnS-GLU concentration observed was $13.3 \pm 2.6 \mu$ M. In the first study, five experimental groups (six rats per group) were administered with pulses (5 min) of low-osmolarity ringer (Fig. 1). The decrease of extracellular osmolarity increased Glu concentration in a dose-dependent way (ANOVA for 270-mOsm dose: $F(3,52) = 1.91, p = 0.138$; 230-mOsm dose: $F(3,50) = 4.48, p < 0.01$; 180-mOsm dose: $F(3,47) = 4.98, p < 0.01$; 130-mOsm dose: $F(3,20) = 18.63, p < 0.001$; 80-mOsm dose: $F(3,17) = 12.95, p < 0.001$), inducing a 35% increase for the 270-mOsm pulse and a 2000% increase for the 80-mOsm pulse. This was a fast and short-lasting effect which was observed during the low-osmolarity pulse and completely vanished 5 min after the stimulus switch off.

The following experiments showed the selective involvement of P2-purinergic receptors on nigral EnS-GLU response to local osmolarity changes. In the second experiment, the pulsatile administration of adenosine (1 mM during 10 min) did not modify the nigral EnS-GLU concentration (Fig. 2A; $n = 5$) (two-way ANOVA, $F(6) = 1.99, p > 0.05$ for the variable minute after administration and $F(1) = 2.08, p > 0.05$). In the third experiment, three groups of rats ($n = 6$) were administered with vehicle (ringer), 2MeSATP (100 μ M) or ATP (1 μ M) pulses of 5 min. Both 2MeSATP (ANOVA, $F(4) = 3.18, p < 0.05$) and ATP (ANOVA, $F(4) = 4.5, p < 0.01$) increased the nigral EnS-GLU

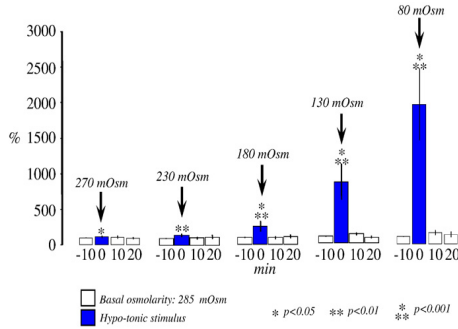


Fig. 1. Glutamate release under hypo-osmotic conditions. Dose-dependent increase (285–80 mOsm) of EnS-GLU during hypo-osmotic ringer perfusion. Values are percentages of the basal levels 10 min before the hypo-osmolar pulse administration (mean \pm standard error).

concentration (Fig. 2B), an affect that disappeared 5 min after the drug withdrawal. In the fourth experiment, five groups ($n = 5$) were administered with increasing ATP doses (10 μ l in 5 min of a ringer

solution with 0.1, 1, 10, 50 and 100 μ M ATP). ATP induced a dose-dependent increase of extrasynaptic Glu (Fig. 2C; ANOVA, $F(4) = 19.26$, $p < 0.001$).

In the fifth experiment, two groups (six rats each) were administered with a hypo-osmolarity pulse (180 mOsm during 5 min). One of the groups was pre-treated with PPADS (ringer solution with 1 mM PPADS administered by the microdialysis probe starting 60 min before the hypo-osmolarity pulse and for the whole study), while the other group was sham treated. Extracellular Glu increased in the sham group during the hypo-osmolar pulse and then returned to the basal level (Fig. 3; ANOVA, $F(4) = 2.95$, $p < 0.05$), a response which was not observed in the PPADS pre-treated group (ANOVA, $F(4) = 0.41$, $p > 0.05$).

The following experiments were aimed at studying the possible involvement of ionotropic GLU receptors on the nigral EnS-GLU response to local osmolarity changes. In the sixth experiment, a group of five rats was administered with CNQX 500 μ M for 40 min. This treatment increased the EnS-GLU concentration (ANOVA, $F(4) = 3.44$, $p < 0.05$), a response that progressively vanished during the following 20 min (Fig. 4A). In the seventh experiment, two groups (six rats each) were administered with hypo-osmolarity pulses (180 mOsm during 10 min). One of the groups was pre-treated with CNQX (1 mM administered by the microdialysis from 60 min before the hypo-osmolarity pulse to the end of the study), while the other group was

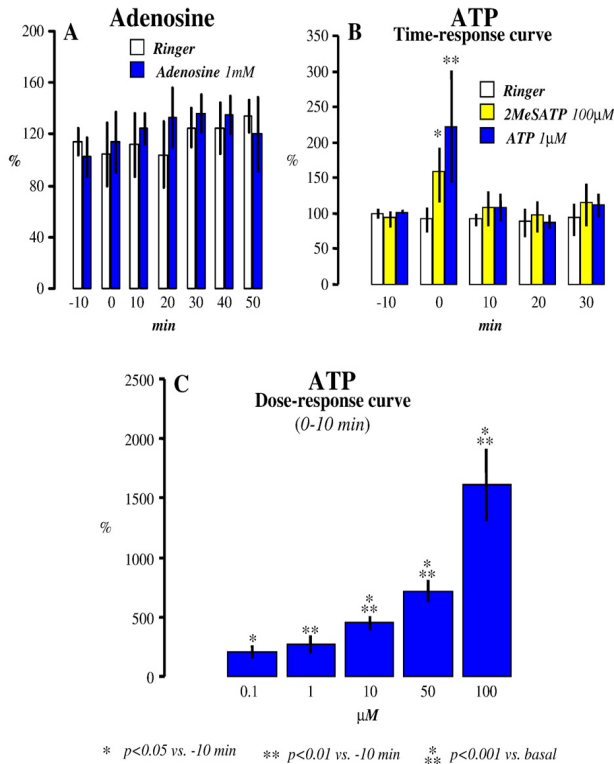


Fig. 2. (A) Glutamate response to the pulsatile administration of adenosine (1 mM for 10 min). (B) Glutamate response to ATP and 2MeSATP administration: Time-response curve for ATP, 2MeSATP and ringer vehicle (pulses of 5 min administered from min 0 to min 5). (C) Dose-response curve of ATP action on EnS-GLU (pulses of 5 min administered from min 0 to min 5). Values correspond to measurements performed on dialysates obtained 0–10 min after the beginning of ATP administration. In these figures, data are shown as percentages of the basal levels computed with the last two dialysates (–20 and –10 min) before drug administration (mean \pm standard error).

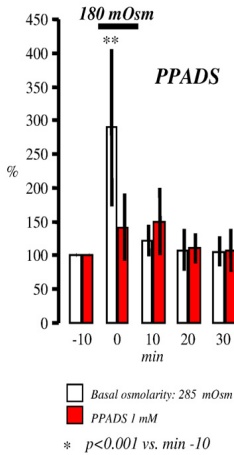


Fig. 3. P2 nucleotide receptor and glutamate response to low osmolarity: effect of blocking P2 receptor with PPADS. PPADS pre-treatment began 60 min before the hypo-osmolarity pulse (180 mOsm during 5 min) and was maintained during the final part of the experiment. Data are shown as percentages of the basal levels 10 min before the hypo-osmolar pulse (mean \pm standard error).

sham treated (ANOVA, $F(4) = 3.70$, $p < 0.01$). The nigral EnS-GLU response to hypo-osmolarity did not change in the animals pre-treated with PPADS (Fig. 4B; ANOVA, $F(4) = 3.10$, $p < 0.05$), suggesting that ionotropic GLU receptors are not involved in the GLUergic response to osmolarity changes.

Discussion

The present study shows a proportional response of the EnS-GLU pool to changes in extracellular osmolarity in the SN, a response

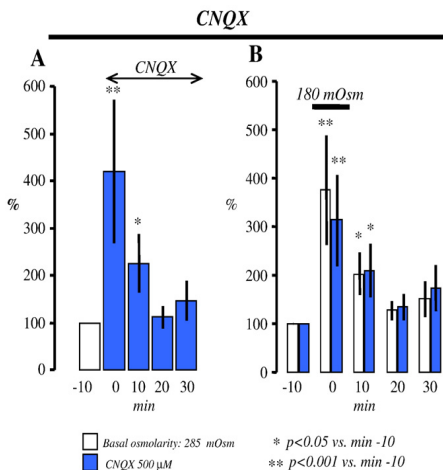


Fig. 4. Glutamate ionotropic receptors and glutamate response to low osmolarity: effect of blocking GLU receptors with CNQX. (A) CNQX effect on extracellular Glu. (B) CNQX pre-treatment began 60 min before the hypo-osmolarity pulse (180 mOsm during 10 min) and was maintained during the final part of the experiment. Data are shown as percentages of the basal levels 10 min before the hypo-osmolar pulse or the CNQX administration (mean \pm standard error).

observed after marked modifications of osmolarity similar to those reported during brain damage but also after small osmolarity changes similar to those observed under physiological conditions. ATP and 2MeSATP (but not adenosine) increased the concentration of EnS-GLU, suggesting that this nigral GLU pool is selectively increased by P2-purinergic receptors. PPADS blocked the increase of the EnS-GLU pool induced by hypo-osmolarity, which suggests these receptors are involved in the osmosensitive response of nigral GLU. Ionotropic GLU receptors were not involved in this response because although their blockade with CNQX increased the nigral EnS-GLU, it did not prevent the EnS-GLU increase induced by hypo-osmolarity. Taken together, the present data show an ATP-mediated GLU release during osmolarity change, suggesting that the osmolarity regulation is a possible mechanism for GLU excitotoxicity in the SN.

As the main excitatory neurotransmitter, GLU induces a short-lasting action (a few milliseconds) in more than 80% of brain synapses (neuronal synaptic GLU pool). Glia may also release GLU (Araque et al., 2000; Bezzi et al., 1998; Bezzi et al., 2004; Overstreet, 2005; Pasti et al., 1997), which induces delayed and persistent effects on extrasynaptic GLU receptors of a large area (Agnati et al., 1995a; Contreras et al., 2002; Zoli et al., 1998). This EnS-GLU pool has been observed in telencephalic centres such as the amygdala (Tucci et al., 1998), hippocampus (Lowy et al., 1993) and striatum (Keefe et al., 1993), where it performs different physiological functions (Keefe et al., 1993; Lowy et al., 1993; Saulskaya and Marsden, 1995; Shinohara et al., 2000; Tucci et al., 1998) acting as volume transmitter (Del Arco et al., 2003). There are some studies suggesting that the high cytosolic concentrations of GLU (mM in the cytosol vs. μ M in the extracellular space) (Nedergaard et al., 2002; Tanaka et al., 1997) could be involved in other physiological functions including osmolarity regulation (Evanko et al., 2004; Franco et al., 2001; Pasantes-Morales et al., 2002; Schwartzkroin et al., 1998). These novel GLU actions have been observed in different telencephalic centres but they have never been studied in the SN. We have observed an EnS-GLU pool in the SN of glial origin (Rodríguez et al., 1998) which could be suitable to perform osmoregulatory actions. The dose-response increase of EnS-GLU observed after the local modifications of osmolarity in the SN is, as far as we know, the first evidence supporting this possibility.

A sensitive response of nigral EnS-GLU (50% increase) was observed after small modifications of extracellular osmolarity (5% osmolarity oscillations are normally considered within the physiological range), suggesting that local osmolarity is an effective regulator of the nigral EnS-GLU pool even under physiological conditions. The osmosensitive response of EnS-GLU was dose dependent, showing a marked GLU increase (500–1000%) after osmolarity changes similar to those occurring under pathological conditions (>20% osmolarity change) (Mongin and Kimelberg, 2005). Bearing in mind the high stability of extracellular GLU concentration (Obrenovitch and Urenjak, 1997; Obrenovitch et al., 1997) induced by astroglial GLU transporters (Rothstein et al., 1996; Tanaka et al., 1997; Watase et al., 1998), present data suggest that, under pathological conditions, the osmotic release of GLU prevails over other GLU activities, which could be a particularly suitable scenario for the excitotoxic actions of this amino acid (Coyle and Puttfarcken, 1993; Matute et al., 2006).

The osmotic release of GLU could be performed by different mechanisms, including the volume-regulated anion channels (Basarsky et al., 1999; Kimelberg et al., 1990; O'Connor and Kimelberg, 1993), hemichannels (Kamerlings et al., 2001; Quist et al., 2000; Wilson et al., 2003) and ATP-linked channels (Queiroz et al., 1997). The bi-directional excitatory GLU-ATP interaction (Jeremic et al., 2001; Mongin and Kimelberg, 2005; Queiroz et al., 1997) made the ATP-linked mechanisms particularly interesting. Present data provide evidence showing the ATP receptors' involvement in the GLU response to extracellular osmolarity in the nigra. There are previous

in vitro studies showing that ATP can activate GLU release (Duan et al., 2003; Fellin et al., 2006; Franke and Illes, 2006; Franke et al., 2006; Rodrigues et al., 2005) but, as far as we know, present data provide the first *in vivo* evidence for this ATP action, particularly in the SN. Bearing in mind that only a portion of ATP perfused by the microdialysis probe reaches the brain (probably no more than 20%), the GLU response observed after very low ATP doses (0.1–1 μM vs. 0.5–5 mM often used in *in vitro* studies) suggests a high sensitivity of the nigral EnS-GLU pool to extracellular ATP. The reduction of the EnS-GLU response to osmotic change observed after PPADS pre-treatment and the previous *in vitro* evidence showing ATP release during swelling (Duan et al., 2003; Fellin et al., 2006; Franke and Illes, 2006; Franke et al., 2006; Rodrigues et al., 2005) suggest that the ATP release is an intermediary pathway in the osmotic response of GLU. EnS-GLU increased after 2MeSATP administration (P2-receptor agonist) but not after adenosine administration (P1-receptor agonist), suggesting that GLU response to ATP involves nucleotide receptors but not nucleoside receptors (which could have been activated after the ectoenzymatic metabolism of ATP to adenosine) (Aguilar et al., 2001; Asensio et al., 2006). In response to extracellular ATP, P2 receptors (Basarsky et al., 1999; Pasantes-Morales and Cruz, 1984) can form large membrane channels permeable for molecules of up to 900 Da (North and Surprenant, 2000) which can facilitate the outflow of GLU from the cytoplasm of glial cells (where GLU is typically >1 mM) to the extracellular space (submicromolar range) (Choi et al., 1987). However, the EnS-GLU response to osmolarity could also involve, in addition to the presently reported ATP/P2-receptor linked response, other glial mechanisms which, such as the opening of swelling-activated anion channels (Darby et al., 2003) or the activation of the vesicle-mediated GLU release (Bezzi et al., 1998; Bezzi et al., 2004; Coco et al., 2003; Parpura et al., 1995; Burgoyne and Morgan, 2003), cannot be presently ruled out. In any case, these mechanisms do not involve the ionotropic GLU receptors (a possibility suggested by a previous study in our laboratory) (Rodríguez et al., 1998), because their blockade with CNQX did not prevent the GLU response to osmolarity changes.

Swelling is a dangerous condition for most mammal cells and particularly for neurons. The most common and efficient adaptation to swelling is the intra/extracellular exchange of low molecular weight solutes, which flowing through the cell membrane force a fast flow of water and the cell-volume regulation. However, the massive efflux of certain molecules can damage both the osmolyte releasing cells (e.g. the ATP loss can cause a lack of energy) and their neighboring cells (e.g. GLU release could cause excitotoxicity). This could be particularly dangerous for nigral dopaminergic neurons, which are specifically vulnerable to the energetic imbalance (Cooper et al., 1991; Schapira et al., 1990) and to the toxic action of glutamate (Jenner and Olanow, 1998; Olanow and Tatton, 1999). The massive GLU release observed here during osmolarity regulation suggests new possibilities for GLU excitotoxicity in PD. An increased firing rate of the GLU neurons that innervate the SN has been proposed as the source for excitotoxic action of GLU. However, the firing increase is produced in response to a previous degeneration of DA neurons and cannot explain the beginning of the illness. In addition, GLU synapses are surrounded by glial cells whose GLU transporters efficiently prevent the increase of extracellular GLU, preventing its extrasynaptic diffusion. Taken together, a previous study (Rodríguez et al., 1998) and present data suggest that glial GLU is a potential source for excitotoxic GLU in the nigra. Compared with the vesicular pool of synaptic GLU, the glial GLU forms a very large pool which can be massively released to the extrasynaptic extracellular space (which avoids the perisynaptic barrier of GLU transporters) and which can have long-lasting action even on distant neurons. These facts, and the recent evidence showing inflammation and swelling in the SN of PD patients, suggest that the osmoregulatory changes of EnS-GLU are a potential source for excitotoxicity, even during the early stages of the illness.

Acknowledgment

Grant sponsor: Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2008-03746), Spain.

References

- Agnati, L.F., Bjelke, B., Fuxe, K., 1995a. Volume versus wiring transmission in the brain: a new theoretical frame for neuropsychopharmacology. *Med. Res. Rev.* 15, 33–45.
- Agnati, L.F., Zoli, M., Stromberg, I., Fuxe, K., 1995b. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69, 711–726.
- Aguilar, J.S., Reyes, R., Asensio, A.C., Oaknin, S., Rotllan, P., Miledi, R., 2001. Ectoenzymatic breakdown of diadenosine polyphosphates by *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Biochem.* 268, 1289–1297.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.
- Araque, A., Li, N., Doyle, R.T., Haydon, P.G., 2000. SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 666–673.
- Asensio, A.C., Rodríguez-Ferrer, C.R., Oaknin, S., Rotllan, P., 2006. Biochemical and immunohistochemical characterisation of human diadenosine triphosphatase provides evidence for its identification with the tumour suppressor Fhit protein. *Biochimie* 88, 461–471.
- Barbour, B., Hauser, M., 1997. Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. *Trends Neurosci.* 20, 377–384.
- Basarsky, T.A., Feighan, D., MacVicar, B.A., 1999. Glutamate release through volume-activated channels during spreading depression. *J. Neurosci.* 19, 6439–6445.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., Volterra, A., 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281–285.
- Bezzi, P., Gunderson, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E., Volterra, A., 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* 7, 613–620.
- Burgoyne, R.D., Morgan, A., 2003. Secretory granule exocytosis. *Physiol. Rev.* 83, 581–632.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., Verderio, C., 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J. Biol. Chem.* 278, 1354–1362.
- Contreras, J.E., Sanchez, H.A., Eugenin, E.A., Speidel, D., Theis, M., Willecke, K., Bukauskas, F.F., Bennett, M.V., Saez, J.C., 2002. Metabolic inhibition induces opening of unopposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 495–500.
- Cooper, J.A., Sagar, H.J., Jordan, N., Harvey, N.S., Sullivan, E.V., 1991. Cognitive impairment in early, untreated Parkinson's disease and its relationship to motor disability. *Brain* 114 (Pt 5), 2095–2122.
- Coyle, J.T., Puttfarcken, P., 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689–695.
- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., Kriegstein, A.R., 1987. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7, 357–368.
- Darby, M., Kuzmiski, J.B., Panenka, W., Feighan, D., MacVicar, B.A., 2003. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J. Neurophysiol.* 89, 1870–1877.
- Del Arco, A., Segovia, G., Fuxe, K., Mora, F., 2003. Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J. Neurochem.* 85, 23–33.
- DeLong, M.R., 1995. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281–285.
- Di Loreto, S., Florio, T., Scarnati, E., 1992. Evidence that non-NMDA receptors are involved in the excitatory pathway from the pedunculopontine region to nigrostriatal dopaminergic neurons. *Exp. Brain Res.* 89, 79–86.
- Duan, S., Anderson, C.M., Keung, E.C., Chen, Y., Chen, Y., Swanson, R.A., 2003. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* 23, 1320–1328.
- During, M.J., Ryder, K.M., Spencer, D.D., 1995. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature* 376, 174–177.
- Evanko, D.S., Zhang, Q., Zorec, R., Haydon, P.G., 2004. Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia* 47, 233–240.
- Fellin, T., Pozzan, T., Carmignoto, G., 2006. Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J. Biol. Chem.* 281, 4274–4284.
- Franco, R., Quesada, O., Pasantes-Morales, H., 2000. Efflux of osmolyte amino acids during isovolumic regulation in hippocampal slices. *J. Neurosci. Res.* 61, 701–711.
- Franco, R., Torres-Marquez, M.E., Pasantes-Morales, H., 2001. Evidence for two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices. *Pflügers Arch.* 442, 791–800.
- Franke, H., Illes, P., 2006. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol. Ther.* 109, 297–324.
- Franke, H., Krugel, U., Illes, P., 2006. P2 receptors and neuronal injury. *Pflügers Arch.* 452, 622–644.
- García Dopico, J., Perdomo Díaz, J., Alonso, T.J., González Hernández, T., Castro Fuentes, R., Rodríguez Díaz, M., 2004. Extracellular taurine in the substantia nigra: taurine-glutamate interaction. *J. Neurosci. Res.* 76, 528–538.

- Gonzalez-Hernandez, T., Rodriguez, M., 2000. Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J. Comp. Neurol.* 421, 107–135.
- Goode, R., Renaud, S., Bonnassie, S., Bernard, T., Blanco, C., 2004. Glutamine, glutamate, and alpha-glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6535–6541.
- Iribe, Y., Moore, K., Pang, K.C., Tepper, J.M., 1999. Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 82, 925–933.
- Jabaudon, D., Shimamoto, K., Yasuda-Kamatani, Y., Scanziani, M., Gähwiler, B.H., Gerber, U., 1999. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8733–8738.
- Jenner, P., Olanow, C.W., 1998. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44, 572–584.
- Jeremic, A., Jęftinija, K., Stevanovic, J., Glavaski, A., Jęftinija, S., 2001. ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 77, 664–675.
- Kamerlings, M., Fahrenfort, I., Schultz, K., Janssen-Bienhold, U., Sjoerdsma, T., Weiler, R., 2001. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science* 292, 1178–1180.
- Keefe, K.A., Sved, A.F., Zigmond, M.J., Abercrombie, E.D., 1993. Stress-induced dopamine release in the neostriatum: evaluation of the role of action potentials in nigrostriatal dopamine neurons or local initiation by endogenous excitatory amino acids. *J. Neurochem.* 61, 1943–1952.
- Kimelberg, H.K., Goderie, S.K., Higman, S., Pang, S., Waniewski, R.A., 1990. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* 10, 1583–1591.
- Lavoie, B., Parent, A., 1994. Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: distribution of cholinergic and monoaminergic neurons in the mesopontine tegmentum with evidence for the presence of glutamate in cholinergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 344, 190–209.
- Lowy, M.T., Gault, I., Yamamoto, B.K., 1993. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J. Neurochem.* 61, 1957–1960.
- MacLeod, R.J., Hamilton, J.R., 1999a. Ca(2+)/Calmodulin kinase II and decreases in intracellular pH are required to activate K(+) channels after substantial swelling in villus epithelial cells. *J. Membr. Biol.* 172, 59–66.
- MacLeod, R.J., Hamilton, J.R., 1999b. Increases in intracellular pH and Ca(2+) are essential for K(+) channel activation after modest 'physiological' swelling in villus epithelial cells. *J. Membr. Biol.* 172, 47–58.
- Marti, M., Shrenna, S., Fuxe, K., Bianchi, C., Beani, L., Morari, M., 2000. Increased responsibility of glutamate release from the substantia nigra pars reticulata to striatal NMDA receptor blockade in a model of Parkinson's disease. A dual probe microdialysis study in hemiparkinsonian rats. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1848–1850.
- Matute, C., Domercq, M., Sanchez-Gomez, M.V., 2006. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia* 53, 212–224.
- Meshul, C.K., Emre, N., Nakamura, C.M., Allen, C., Donohue, M.K., Buckman, J.F., 1999. Time-dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 88, 1–16.
- Mongin, A.A., Kimelberg, H.K., 2005. ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca2+-sensitive mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 288, C204–C213.
- Morales, I., Dopico, J.G., Sabate, M., Gonzalez-Hernandez, T., Rodriguez, M., 2007. Substantia nigra osmoregulation: taurine and ATP involvement. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292, C1934–C1941.
- Nauta, H.J., Cole, M., 1978. Efferent projections of the subthalamic nucleus: an autoradiographic study in monkey and cat. *J. Comp. Neurol.* 180, 1–16.
- Nedergraad, M., Takano, T., Hansen, A.J., 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 748–755.
- Nijijima, K., Yoshida, M., 1988. Activation of mesencephalic dopamine neurons by chemical stimulation of the nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta. *Brain Res.* 451, 163–171.
- North, R.A., Surprenant, A., 2000. Pharmacology of cloned P2_u receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 563–580.
- O'Connor, E.R., Kimelberg, H.K., 1993. Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J. Neurosci.* 13, 2638–2650.
- Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Rodriguez, M., Lanciego, J.L., Artieda, J., Gonzalo, N., Olanow, C.W., 2000. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23, 58–59.
- Obrenovitch, T.P., Richards, D.A., 1995. Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 7, 1–54.
- Obrenovitch, T.P., Urenjak, J., 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog. Neurobiol.* 51, 39–87.
- Obrenovitch, T.P., Urenjak, J., Zilkha, E., 1997. Effects of increased extracellular glutamate levels on the local field potential in the brain of anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* 122, 372–378.
- Olanow, C.W., Tatton, W.G., 1999. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 123–144.
- Overstreet, L.S., 2005. Quantal transmission: not just for neurons. *Trends Neurosci.* 28, 59–62.
- Parent, A., Hazrati, L.N., 1995a. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.* 20, 91–127.
- Parent, A., Hazrati, L.N., 1995b. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res. Rev.* 20, 128–154.
- Parpura, V., Liu, F., Brethorst, S., Jęftinija, K., Jęftinija, S., Haydon, P.G., 1995. Alpha-latrotoxin stimulates glutamate release from cortical astrocytes in cell culture. *FEBS Lett.* 360, 266–270.
- Pasantes-Morales, H., Cruz, C., 1984. Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments. *J. Neurosci. Res.* 11, 303–311.
- Pasantes-Morales, H., Franco, R., Ordaz, B., Ochoa, L.D., 2002. Mechanisms counteracting swelling in brain cells during hyponatremia. *Arch. Med. Res.* 33, 237–244.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., Carmignoto, G., 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 17, 7817–7830.
- Queiroz, G., Gebicke-Haerter, P.J., Schober, A., Starke, K., von Kugelgen, I., 1997. Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. *Neuroscience* 78, 1203–1208.
- Quist, A.P., Rhee, S.K., Lin, H., Lal, R., 2000. Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isometric volume regulation. *J. Cell. Biol.* 148, 1063–1074.
- Rinvik, E., Ottersen, O.P., 1993. Terminals of subthalamic axonal fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat. *J. Chem. Neuroanat.* 6, 19–30.
- Rodrigues, R.J., Almeida, T., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., 2005. Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 25, 6286–6295.
- Rodriguez, M., Gonzalez-Hernandez, T., 1999. Electrophysiological and morphological evidence for a GABAergic nigrostriatal pathway. *J. Neurosci.* 19, 4682–4694.
- Rodriguez, M.C., Obeso, J.A., Olanow, C.W., 1998. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann. Neurol.* 44, S175–S188.
- Rodriguez Diaz, M., Alonso, T.J., Perdomo Diaz, J., Gonzalez Hernandez, T., Castro Fuentes, R., Sabate, M., Garcia Dopico, J., 2005. Glial regulation of nonsynaptic extracellular glutamate in the substantia nigra. *Glia* 49, 134–142.
- Rodriguez-Oroz, M.C., Rodriguez, M., Guridi, J., Mewes, K., Chockkman, V., Vitek, J., DeLong, M.R., Obeso, J.A., 2001. The subthalamic nucleus in Parkinson's disease: somatotopic organization and physiological characteristics. *Brain* 124, 1777–1790.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F., 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675–686.
- Saulskaya, N., Marsden, C.A., 1995. Extracellular glutamate in the nucleus accumbens during a conditioned emotional response in the rat. *Brain Res.* 698, 114–120.
- Scanziani, M., 2002. Competing on the edge. *Trends Neurosci.* 25, 282–283.
- Scarnati, E., Proia, A., Campana, E., Pacitti, C., 1986. A microiontophoretic study on the nature of the putative synaptic neurotransmitter involved in the pedunculopontine-substantia nigra pars compacta excitatory pathway of the rat. *Exp. Brain Res.* 62, 470–478.
- Schapira, A.H., Mann, V.M., Cooper, J.M., Dexter, D., Daniel, S.E., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D., 1990. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 55, 2142–2145.
- Schwartzkroin, P.A., Baraban, S.C., Hochman, D.W., 1998. Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability. *Epilepsy Res.* 32, 275–285.
- Shinohara, K., Honma, S., Katsuno, Y., Honma, K., 2000. Circadian release of excitatory amino acids in the suprachiasmatic nucleus culture is Ca(2+)-independent. *Neurosci. Res.* 36, 245–250.
- Tanaka, K., Watake, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K., 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699–1702.
- Tucci, S., Rada, P., Hernandez, L., 1998. Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain Res.* 813, 44–49.
- Tuz, K., Ordaz, B., Vaca, L., Quesada, O., Pasantes-Morales, H., 2001. Isovolumetric regulation mechanisms in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* 79, 143–151.
- Watake, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Sakagawa, T., Ogawa, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K., Tanaka, K., 1998. Motor discordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 10, 976–987.
- Wilson, A.A., Johnson, D.P., Mozley, D., Hussey, D., Ginovart, N., Nobrega, J., Garcia, A., Meyer, J., Houle, S., 2003. Synthesis and in vivo evaluation of novel radiotracers for the in vivo imaging of the norepinephrine transporter. *Nucl. Med. Biol.* 30, 85–92.
- Zoli, M., Torri, C., Ferrarri, R., Jansson, A., Zimi, I., Fuxe, K., Agnati, L.F., 1998. The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res. Rev.* 26, 136–147.

Self-Induced Accumulation of Glutamate in Striatal Astrocytes and Basal Ganglia Excitotoxicity

INGRID MORALES^{1,2} AND MANUEL RODRIGUEZ^{1,2*}

¹Laboratory of Neurobiology and Experimental Neurology, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of La Laguna, La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

KEY WORDS

glutamate; astrocyte; striatum; excitotoxicity

ABSTRACT

Excitotoxicity induced by high levels of extracellular glutamate (GLU) has been proposed as a cause of cell degeneration in basal ganglia disorders. This phenomenon is normally prevented by the astrocytic GLU-uptake and the GLU-catabolization to less dangerous molecules. However, high-GLU can induce reactive gliosis which could change the neuroprotective role of astrocytes. The striatal astrocyte response to high GLU was studied here in an *in vivo* rat preparation. The transient striatal perfusion of GLU (1 h) by reverse microdialysis induced complex reactive gliosis which persisted for weeks and which was different for radial-like glia, protoplasmic astrocytes and fibrous astrocytes. This gliosis was accompanied by a persistent cytosolic accumulation of GLU (immunofluorescence quantified by confocal microscope), which persisted for weeks (self-induced glutamate accumulation), and which was associated to a selective decrease of glutamine synthetase activity. This massive and persistent self-induced glutamate accumulation in striatal astrocytes could be an additional factor for the GLU-induced excitotoxicity, which has been implicated in the progression of different basal ganglia disorders. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

The excessive release of glutamate (GLU) is considered as a direct cause of cell degeneration (excitotoxicity) in neurological disorders, such as Huntington's disease (HD) (Albin et al., 1992; Douaud et al., 2009; Kasubek et al., 2005) and Parkinson's disease (PD) (During et al., 1995; Jenner and Olanow, 1998; Marti et al., 2000; Meshul et al., 1999; Obrenovitch and Richards, 1995; Olanow and Tatton, 1999; Rodriguez et al., 1998). The astrocytic uptake (Bezzi et al., 1998; de Groot and Sontheimer, 2011; Halliday and Stevens, 2011; McGeer and McGeer, 2008; Morales et al., 2009; Obrenovitch and Urenjak, 1997; Rodriguez Diaz et al., 2005; Sofroniew and Vinters, 2010) and catabolization of GLU to less dangerous molecules, such as glutamine, alanine, and α -ketoglutarate (Marcaggi and Attwell, 2004; Sofroniew, 2009; Sofroniew and Vinters, 2010) are presently considered as being critical in preventing excitotoxicity. When the extracellular-GLU increase cannot be prevented, astrocytes show a progressive modification (reactive astrogliosis) which can alter its neuroprotective role

(Raivich et al., 1999; Streit et al., 1999). Although reactive astrocytes prevent neuronal death by taking up GLU (McGeer and McGeer, 2008; Teismann and Schulz, 2004) and releasing neuroprotective products (such as glial-derived neurotrophic factor or glutathione), they also release toxic agents (reactive oxygen species, nitric oxide, excitatory amino acids...) which activate microglial cells (de Groot and Sontheimer, 2011; Hazell, 2007; McCarty, 2006; McGeer and McGeer, 2008; Perry et al., 1995; Rappold and Tieu, 2010; Vesce et al., 2007) and induce cell degeneration (Rappold and Tieu, 2010; Sofroniew and Vinters, 2010). Thus, the actual effect of reactive astrocytes on GLU excitotoxicity is still a point of discussion.

Studies on hippocampal slices (Xu et al., 2007) have shown a progressive accumulation of GLU in astrocytes transiently exposed to a high concentration of GLU (self-induced glutamate accumulation; SIGA). Because astrocytic GLU can suddenly be released to the extracellular medium (Xu et al., 2007), SIGA could explain the neuronal degeneration found in different pathological conditions, including that often observed in the vicinity of brain tumours and ictus (de Groot and Sontheimer, 2011; Hazell, 2007). The generation of SIGA in other centers, such as the striatum could provide useful clues to explain the degeneration of neurons (Andre et al., 2010; Beal et al., 1986; Beal et al., 1988; Coyle, 1987; Coyle and Schwarcz, 1976; McGeer et al., 1978) and glial cells (Haas and Erdo, 1991; Matute, 1998; Matute et al., 2006; McDonald et al., 1998; Yoshioka et al., 1995) in different disorders of the basal ganglia, such as HD and PD (Andre et al.; Halliday and Stevens, 2011; Marcaggi and Attwell, 2004; Obeso et al., 2010; Rappold and Tieu, 2010). The striatum is a basal ganglia center, which supports massive GLUergic inputs arriving from the brain cortex and thalamus, and whose glial cells have proved able to accumulate and release GLU (Del Arco et al., 2003; Obeso et al., 2008; Rodriguez Diaz

Grant sponsor: Plan Nacional I+D+I del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2008-03746) and CIBERNED (2011/02), Spain.

*Correspondence to: Manuel Rodríguez Díaz, Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain. E-mail: mrdiaz@ull.es

Received 21 November 2011; Revised 10 May 2012; Accepted 21 May 2012

DOI 10.1002/glia.22368

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

et al., 2005), factor which could create the conditions for SIGA to take place.

The possible induction of SIGA in the striatum was tested here in an "in vivo" preparation where GLU can be locally perfused in the extracellular medium. A small probe which induces minimal unspecific lesions during tissue penetration (a 220 μm diameter probe introduced in the brain at the rate of 100 $\mu\text{m}/\text{min}$) and no lesion during the volume perfusion (reverse microdialysis) was used (Rodriguez et al., 2006). The storage of GLU in glial cells was studied by confocal microscope, and the possible mechanisms for SIGA were studied by quantifying the GLU, glutamine, and alanine release with microdialysis/high performance liquid chromatograph (HPLC).

MATERIAL AND METHODS

Experiments were carried out on male Sprague–Dawley rats weighing 300–350 g. Animals were housed at 22°C, two per cage, under normal laboratory conditions on a standard light-dark schedule (12:12 with 3.00–15.00 light on) and free access to food and water. Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures and adequate measures were taken to minimize pain and discomfort.

Microdialysis

Microdialysis was performed according to previously reported procedures (Garcia Dopico et al., 2004; Rodriguez Diaz et al., 2005). Animals were anaesthetized with equitensine (pentobarbital 29 mg/kg, chloral hydrate 127.5 mg/kg, MgSO_4 71.4 mg/kg, dihydroxypropane 40% and ethanol 10%). To maintain a long-lasting stable anesthesia, animals were continuously ip perfused with equitensine (0.5 mL/h) beginning 60 min after the initial ip administration of the anesthetic. Body temperature was monitored and maintained between 36.5 and 37.0°C for the whole session. A concentric microdialysis probe (220 μm diameter, 3 mm long and *in vitro* recovery of $\approx 15\%$ for amino acids) was introduced in the striatum (1.0 mm anterior to bregma, 2.5 mm lateral to the midline and 7.5 mm under the cortical surface) at a rate of 100 $\mu\text{m}/\text{min}$ to prevent unspecific lesions during the tissue penetration. Rats were perfused with a ringer solution (NaCl 148 mM; KCl 2.7 mM; CaCl_2 1.2 mM; and MgCl_2 0.8 mM) at the beginning of each experiment (first 90 min), and then either a glial GLU-uptake inhibitor (L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate, PDC, Tocris), or glutamine synthetase inhibitor (methionine sulfoximide, MSO, Sigma) or glutamate (GLU, Sigma) was introduced in the ringer-solution for 60 min. All solutions were perfused at a rate of 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Biochemical Analyses

Glutamate, glutamine, and alanine were determined in brain dialysates by using a HPLC system (4 μm C18 reverse-phase column 100 \times 4.6 mm) with fluorimetric detection. Precolumn derivatization was performed with o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol/borate reagent (pH = 10.4). Dialysate (10 μL) was derivatized with the same volume of the o-phthalaldehyde reagent solution (P0532 of SIGMA, Saint Louis), and after a 120 sec reaction period (6°C in a 717plus autosampler; Waters, Milford), the reaction was stopped with 5 μL acetic acid (5%) and the sample was immediately injected into a HPLC. The mobile phase (pH = 5.65) was composed of sodium acetate (0.05 M), methanol (5%), and isopropyl alcohol (1.36%) and flowed at 1.0 mL/min in a gradient (20 min duration) from 25% to 75% methanol (Rodriguez Diaz et al., 2005). The excitation wavelength of the fluorimetric detector (Model 474; Waters, Milford) was set at 370 nm and the emission cut-off filter was set at 450 nm. The recovery rate of the microdialysis probe was tested *in vitro* at the beginning of each experiment for the posterior calculation of the extracellular GLU-concentration, and for the adjustment of the GLU and GLU-agonists dose according to the recovery rate of each probe. The acute effect of GLU, MSO, and PDC administration on the extracellular concentration of glutamate, glutamine and alanine was studied in 5, 7, and 8 rats, respectively.

Histology

From 1 to 6 weeks after the end of each experiment, the rats were transcardially perfused with 200 mL of 0.9% saline solution followed by 400 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH = 7.4 (PBS). Brains were removed and stored in the same fixative at 4°C for 4 h, immersed in a cryoprotective solution of 30% sucrose in the same buffer for 24 h and then cut at 30 μm with a sliding microtome (HM 450, MICROM International GmbH; Walldorf). To observe the effect of injected drugs at different distances from the microdialysis probe, brains were cut following axial planes parallel to the surface of the brain cortex and perpendicular to the probe trajectory. Sections were collected in 7 parallel series and processed for immunohistochemistry. Floating sections were immersed for 20 min in 3% H_2O_2 to inactivate endogenous peroxidase, and incubated for 60 min at room temperature (RT) in 4% normal goat serum (NGS, Sigma-Aldrich, Madrid) in PBS, containing 0.05% Triton X-100 (TX-100, Sigma-Aldrich, Madrid), and overnight in PBS containing 2% NGS and one of the following primary antibodies: mouse anti-glial fibrillary acidic protein (anti-GFAP) monoclonal antibody (1:800; Chemicon, Millipore, Molsheim, France), mouse anti-macrosialin (anti-CD68) monoclonal antibody (1:1000; ABD Serotec, Bionova, Madrid), rabbit anti-glial fibrillary acidic protein polyclonal antibody (1:1000; Sigma, Madrid, Spain), rabbit anti-glutamate (anti-

GLU) polyclonal antibody (1:1000; Sigma, Madrid, Spain), mouse calbindin (anti-calbindin) monoclonal antibody (1:500; Sigma, Madrid, Spain), and mouse anti-NeuN monoclonal antibody (1:600; Chemicon, Millipore, Molsheim, France). For double immunofluorescent labeling, sections were first incubated for 1 h in 4% NGS and 0.05% Tx-100 in PBS, and overnight in the same solution containing the rabbit anti-GLU + mouse anti-GFAP, rabbit anti-GFAP + mouse anti-NeuN, or mouse anti-Calbindin + rabbit anti-GLU. Finally, sections were incubated for 2 h with RhodamineRedX-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:3000; Jackson ImmunoResearch) and Biotine-goat anti-mouse (1:1200) in PBS containing 1:200 NGS followed by CY2-conjugated streptavidine (1:200; Jackson ImmunoResearch) in PBS containing 1:200 NGS. After several rinses, sections were mounted on gelatinized slides, air dried, coverslipped with Vectashield (Vector), and examined under confocal microscopy (Olympus Fluoview FV1000) using appropriate filters. Some sections were incubated in DAPI 300 nM/PBS for 1 min just before their drying and coverslip. Control experiments were performed for each immunocytochemistry and immunofluorescence study by removing the primary antibody, resulting in negative staining.

Immunoreactivity Quantification

Astrocytic reaction to GLU administration was evaluated by comparing the GFAP and GLU immunoreactivity of GLU-perfused striatum with that of vehicle-perfused striatum. The average of the GFAP-immunofluorescence intensity of the area (3000 voxels), which in each astrocytic process showed the highest immunofluorescence signal was used to estimate the GFAP-immunoreactivity. Then, the GLU-immunofluorescence intensity computed in these astrocytic regions was used to represent the GLU-immunoreactivity. At least 2000 astrocytic processes were computed in each experimental condition, astrocytic cell-type and brain side. Computations were performed in images of 10 μm high \times 10 μm long \times 2 μm wide obtained with a spatial resolution of 1025 \times 1025 pixels and an immunofluorescence-signal resolution of 12 bits. Measurements were performed with the FV10-ASW (version 01.07.01.00) software (Olympus Corporation).

To prevent differences due to variations in protocol conditions during tissue processing and densitometric analysis, all sections were processed simultaneously using the same protocols and chemical reagents, and all microscopic and computer parameters were kept constant throughout the densitometric study. Because, even under these conditions, a number of variables can produce intertrial fluctuations of immunostaining, data were normalized with those obtained in the same striatal region of the contralateral brain side and represented as a percentage of the mean value computed in the astrocytic processes of the contralateral striatum. In each brain slice, the same number of astrocytic processes was computed in the striatum of both brain sides.

Different computations were performed for protoplasmic and fibrous astrocytes. The position and boundaries of fiber tracts within the striatum were located with phase-contrast microscopy (shown in black and white images in the different figures), with astrocytes being considered as fibrous if they were located within fiber tracts and had long slender processes parallel to the fiber tracts (Raivich et al., 1999). Protoplasmic astrocytes were located in the gray matter and exhibited numerous short and highly ramified processes with many membranous extensions. The GFAP- and GLU-immunoreactivity of protoplasmic astrocytes were computed separately for regions with moderate astrogliosis and with severe astrogliosis. According to previous studies (Sofroniew and Vinters, 2010), the astrogliosis of a region was considered as being moderate if their astrocytes were hypertrophic and had high GFAP-immunoreactivity (vs. astrocytes in the contralateral striatum), but their processes did not show pronounced overlapping (no disruption of individual cell domains). Astrogliosis was considered as being severe if their astrocytes showed a marked up regulation of GFAP expression, hypertrophy and pronounced overlapping of their processes with disruption of the individual cell domain.

Statistics

Mathematical analyses were performed using the one way ANOVA followed by the Scheffé test for *post hoc* comparisons. Analysis was performed using the Statistic program (Statsoft; Tulsa). A level of $P < 0.05$ was considered as critical for assigning statistical significance.

RESULTS

Unspecific Effects of Microdialysis

After the insertion of the microdialysis probe and the GLU-vehicle perfusion, the sham-striatum showed a small lesion along the probe tract (see microglia CD68+ cells in Fig. 1.1) surrounded by a moderate astrogliosis around the lesion (compare Fig. 1.4 vs. 1.3). The astrogliosis was observed in both the protoplasmic and fibrous astrocytes, but only in those located closest to the probe tract (Fig. 1.5 and 1.7). Occasionally, some radial processes were observed on the lesion edges (see blue arrows in Fig. 1.5 and compare with the GLU-induced radial processes commented in the next paragraph). The GLU-immunostaining was high in the reactive microglia that occupied the cavity induced by the microdialysis probe in the striatal parenchyma (Fig. 1.2), but it was weak or non-existent in the surrounding astrocytes (yellow arrows in Fig. 1.6). The GLU-immunostaining of synaptic terminals around the striatal neurons was of a medium degree (Fig. 1.10 shows the GLU-immunoreactivity around the calbindin+ neurons shown in Fig. 1.9), but more marked than that observed in the astrocytes (pink arrows in Fig. 1.6 and 1.8).

Unspecific microdialysis action on astrocytes and microglia

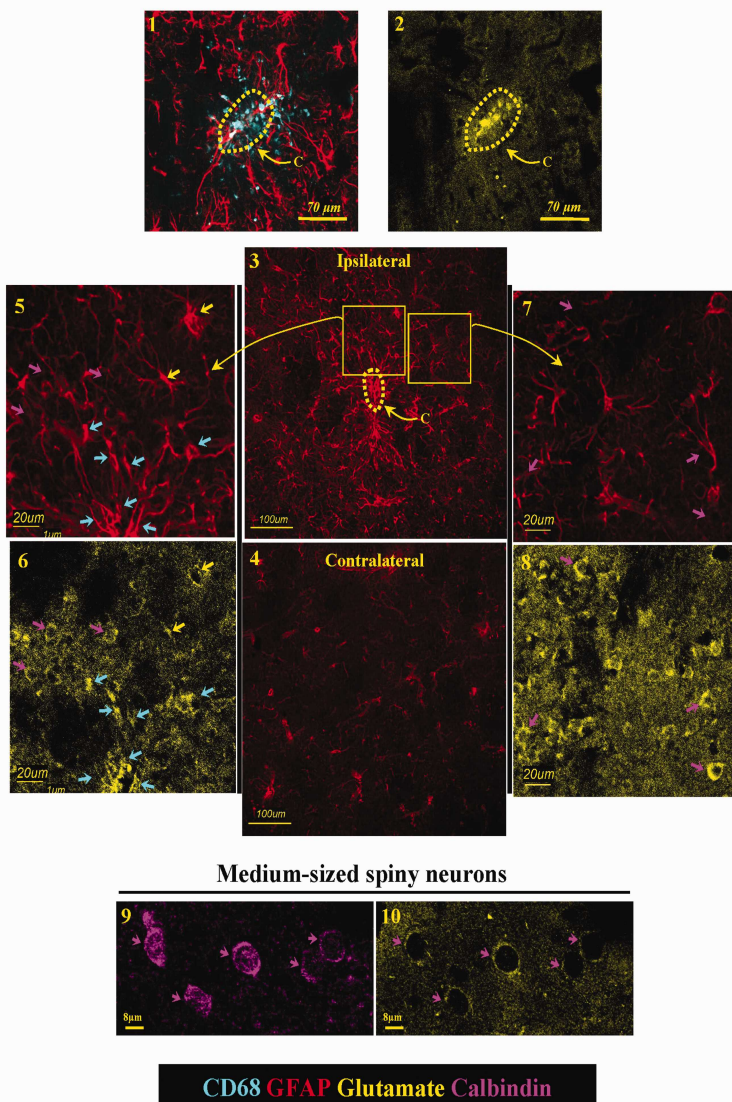


Fig. 1. Unspecific effect of microdialysis on astrocytes and microglia. Axial view of microglial cells (CD68-immunoreactivity is shown in blue in 1), astrocytes (GFAP-immunoreactivity is shown in red in 1, 3, 4, 5, and 7), and neurons (calbindin-immunoreactivity is shown in pink in 9). GLU is shown in yellow. GLU accumulation is shown as follows: in

microglia in 2, in neurons in 6, 8, and 10 (pink arrows) and in astrocytes in 6 and 8 (yellow arrows for astrocytes and blue arrows for radiated processes). C: central region penetrated by the microdialysis probe. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

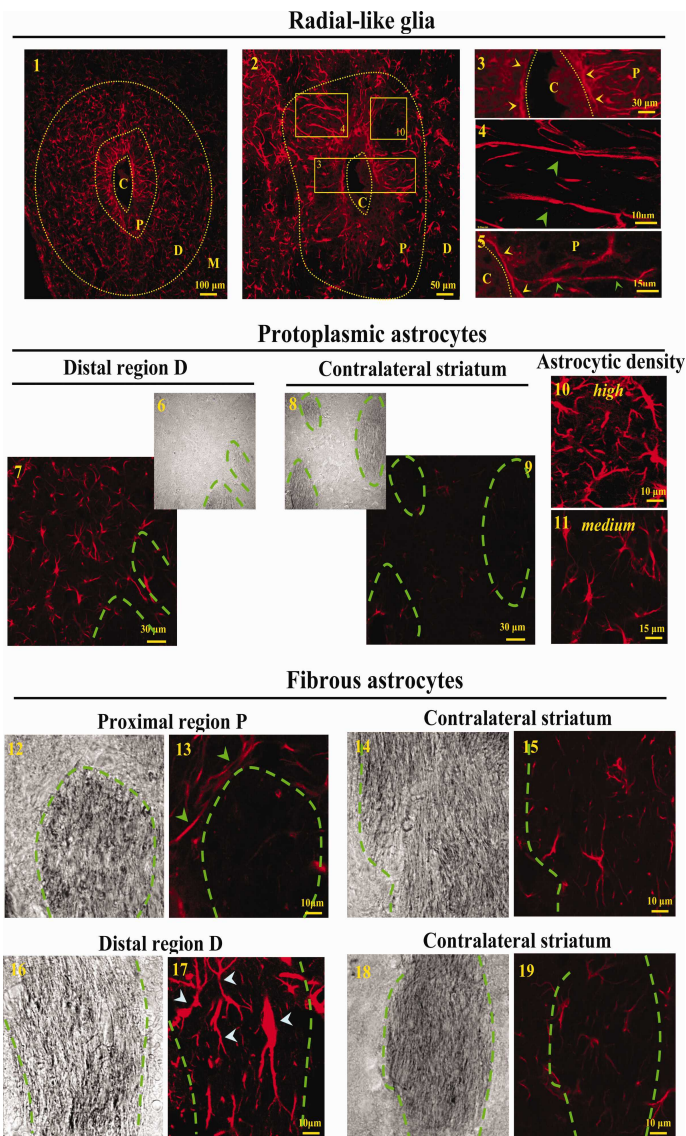


Fig. 2. Axial view of the reactive gliosis activated after GLU-perfusion around the insertion of the microdialysis probe. Red images show the GFAP-immunoreactivity in radial-like glia (top), protoplasmic astrocytes (middle), and fibrous astrocytes (bottom). Black and white images show the striatal distribution of fiber tracts (black lines within the boundaries of striatal tracks which are indicated by discontinuous green lines) within the striatal parenchyma (white). C: central region which was penetrated by the microdialysis probe. P: proximal region showing radial (green arrowheads) and scar (yellow arrowheads) processes. D: distal region showing protoplasmic astrocytes and fibrous astrocytes (blue arrowheads). The P region shows a lack of protoplasmic and fibrous astrocytes (compare Figs. 13 and 15), but presents capsular

GFAP-processes around the C region (yellow arrows in 3 and 5) and radiated GFAP-processes which extended perpendicularly to the capsules (green arrowheads in Figs. 4 and 5), and which occasionally made direct contact with them (5). The D region showed a marked reactive astrogliosis of protoplasmic (outside the discontinuous lines in Figs. 6 and 9) and fibrous astrocytes (outside the discontinuous lines in 6 and 9). The density of protoplasmic astrocytes was higher in D zones closest to the P region, where they showed a disruption of the individual domains (10). Fibrous astrocytes also showed hypertrophy and up regulation of GFAP-immunoreactivity in the D region (Figs. 17 vs. 19). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

GLU Induces a Marked Reactive Astrogliosis

GLU administration induced a marked reactive astrogliosis in the striatum which changed depending on the distance from the microdialysis probe. Three concentric regions were identified around the probe. No astrocytes were observed in the central regions which were penetrated by the probe (central region; C in Fig. 2.1). Regions around C (proximal region; P in Fig. 2.1) showed not only GFAP⁺ processes forming a capsule around the C region, referred to here as scar processes (see yellow arrows in 2.3 and 2.5), but also long, thin GFAP⁺ radial shaped processes extending perpendicularly from the aforementioned capsule (radial processes; see Fig. 2.2 and green arrows in Fig. 2.4 and 2.5). Occasionally, scar processes made contact with radial processes (see Fig. 2.5) suggesting that both belong to the same cell type. Bearing in mind that radial processes were much more evident than scar processes, these GFAP⁺ cells are referred to as radial-like cells. An interesting finding was the lack of both protoplasmic and fibrous astrocytes in the P region (compare Fig. 2.13 and 2.15).

The striatum around the P region (distal region D in Fig. 2.1) showed a clear reactive astrogliosis in both protoplasmic and fibrous astrocytes. Protoplasmic astrocytes were located in the gray matter (outside the discontinuous lines in Fig. 2.6–2.9), showing a much more marked expression of GFAP in the P region of the injected striatum than in the same location of the contralateral striatum (compare Fig. 2.7 and 2.9) or in the sham-perfused striatum. The density of protoplasmic astrocytes in the striatal parenchyma was higher in zones of the D region closest to the P region. Astrocytes, in these zones, showed the disruption of the individual domains which characterize severe reactive astrogliosis (Fig. 2.10). Although astroglial cells from the most peripheral areas of the P regions showed a high GFAP-immunoreactivity, their density in the striatal parenchyma was normal, thus preserving their individual domains (moderate reactive astrogliosis; see Fig. 2.11). Fibrous astrocytes also showed hypertrophy and a marked up regulation of GFAP-immunoreactivity in the D region (compare Fig. 2.17 and 2.19).

Finally, both protoplasmic and fibrous astrocytic cells 0.7–1.5 mm from the central C region showed a shape and GFAP expression similar to those found in the normal contralateral striatum (marginal region M in Fig. 2.1).

Reactive Astrogliosis Induced by GLU Administration Shows Intracellular Accumulation of GLU

A marked accumulation of GLU was found in the C region (although these data are not shown the GLU-accumulation they can be observed on the right edge of the C region shown in Fig. 3.5 and 3.7 and in Fig. 4.13). In the P region (Fig. 2.2), both radial (Fig. 3.8 and 3.9) and scar (Fig. 3.4–3.7) processes showed a marked immunoreactivity for GLU. A similar high GLU-immunoreactivity

was observed for protoplasmic (Fig. 3.10 and 3.11) and fibrous (Fig. 3.12–3.14) astrocytes in the D region.

The GLU-immunoreactivity of astroglial cells around the penetration of the microdialysis probe was normalized according to that computed in astroglial cells from the same region of the contralateral striatum. This normalized immunoreactivity was then used to compare the GLU-perfused and Sham-perfused striatum. At the top of Fig. 4, there is an example (with different magnifications) of the GLU-immunoreactivity of protoplasmic astrocytes in the brain-side perfused with GLU (lesion) vs. the contralateral striatum (contralateral). GLU perfusion induced a marked increase of GFAP-immunoreactivity in protoplasmic (Fig. 4.8 vs. 4.9, and Fig. 4.10 vs. 4.11) and fibrous (Fig. 1.27 vs. 1.30) astrocytes, an effect which was much more marked than that observed in SHAM-perfused rats (see Fig. 4.18 and 4.32). Somata and processes from these astrocytes showed a marked GLU-immunoreactivity, an effect observed in both protoplasmic (compare Fig. 4.14 vs. 4.15, and Fig. 4.16 vs. 4.17) and fibrous (Fig. 4.28 vs. 4.31) astrocytes, but not in sham-perfused animals (Figs. 1.19 and 1.33). Thus, whereas the GLU-immunoreactivity was mainly found in the innervation of neurons in the nonperfused striatum (see red arrows in Fig. 4.16), the GLU-immunoreactivity in the GLU-perfused striatum was mainly found in astrocytes (see green arrows in Fig. 4.17) where it showed a marked colocalization with the GFAP-immunoreactivity (Fig. 4.5). Both the GFAP-immunoreactivity (Fig. 4.24) and the GLU-immunoreactivity (Fig. 4.25) was more marked in the D region with severe astrogliosis (with disruption of the individual cell domains) than in the D region with moderate astrogliosis (without disruption of the individual cell domains) (compare Fig. 4.20 vs. 4.21, and Fig. 4.22 vs. 4.23).

Similar comparisons could not be performed for radial-like glia because these cells from the P region of the GLU-perfused striatum were only occasionally observed in the sham-perfused striatum, and were not observed in the striatum contralateral to the microdialysis insertion.

Persistence of Reactive Astrogliosis and GLU-Accumulation

Only a portion of the reactive astrogliosis which accumulated GLU 1 week after GLU-administration remained during the 6 weeks of the study. Radial-like glia (scar and radial processes) completely vanished 6 weeks after GLU-administration. The P region previously occupied by radial glia was later replenished (Fig. 5.1 and 5.2) by protoplasmic astrocytes (see striatal zones around the C region in Fig. 5.2 and 5.3). In addition, the striatal parenchyma around the C region lost all the neurons (striatum around C region in Fig. 5.6 and 5.7). Thus, region P which was occupied by radial glia during the first post-injection week (and which showed a complete loss of neurons) was later replenished by new protoplasmic astrocytes. Therefore, 6 weeks after GLU-perfusion, the boundary between P

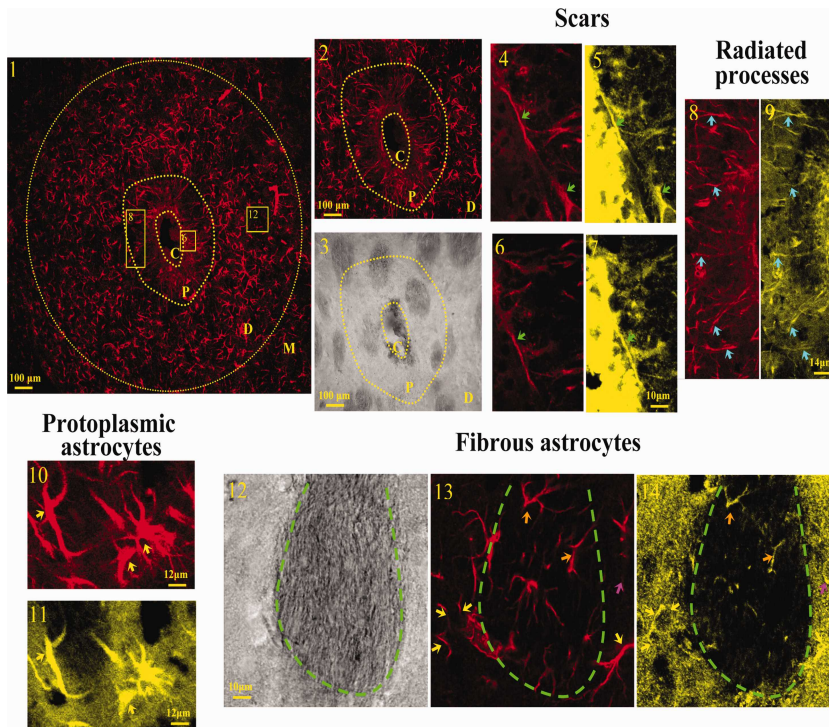


Fig. 3. Axial view of the reactive gliosis and GLU-accumulation activated after GLU-perfusion around the area of insertion of the microdialysis probe. The cell immunoreactivity for GFAP is shown in red and for glutamate in yellow. Black and white images show the striatal distribution of fiber tracts (black lines within the discontinuous green lines which indicate the tract boundary). C: central region which was penetrated by the microdialysis probe. P: proximal region showing radial (green arrows) and scar (yellow arrows) processes. D: distal region showing protoplasmic astrocytes and fibrous astrocytes (blue arrows).

Scar processes: green arrows. Radial processes: blue arrows. Protoplasmic astrocytes: yellow arrows. Fibrous astrocytes: orange arrows. A marked accumulation of GLU was found in the C region (left side of Figs. 5 and 7). Both radiated (Figs. 8–9) and scar (Figs. 4, 5 and 6, 7) processes showed a marked immunoreactivity for GLU. A similar high GLU-immunoreactivity was observed for protoplasmic (Figs. 10–11) and fibrous (Figs. 13–14) astrocytes in the D region. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

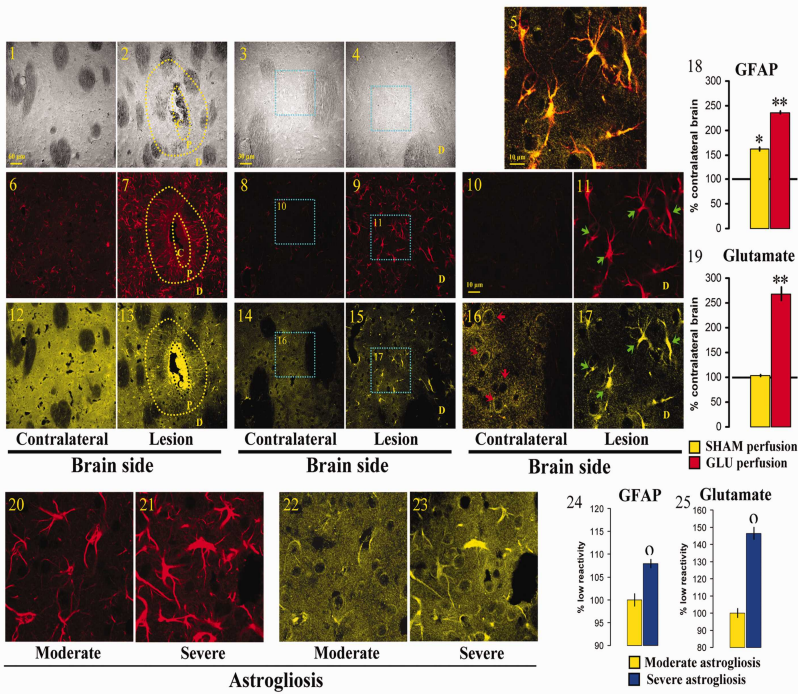
and D regions was identified by the absence of neurons in the P regions and the presence of neurons in the D region, instead of by the presence of radial-like astrocytes in the P region. Protoplasmic astrocytes remained hypertrophic and with a high expression of GFAP, but they were then located in both the P and D regions. No clear astrocytic differences were observed between the P and D regions (compare Fig. 5.3 vs. 5.4).

Although the high GFAP-immunoreactivity persisted in protoplasmic astrocytes 6 weeks after GLU-administration (Fig. 6.4), the high GLU-immunoreactivity decreased to values below those computed for astrocytes of the contralateral striatum (Fig. 6.8; see Fig. 6.3 and 6.7). In fibrous astrocytes, the high GFAP-immunoreactivity persisted 6 weeks after GLU-administration (Fig. 6.12 and compare Fig. 6.10 and 6.14), but in this case the GLU-immunoreactivity remained high during this tardy stage (Fig. 6.16 and compare Fig. 6.11 and 6.15).

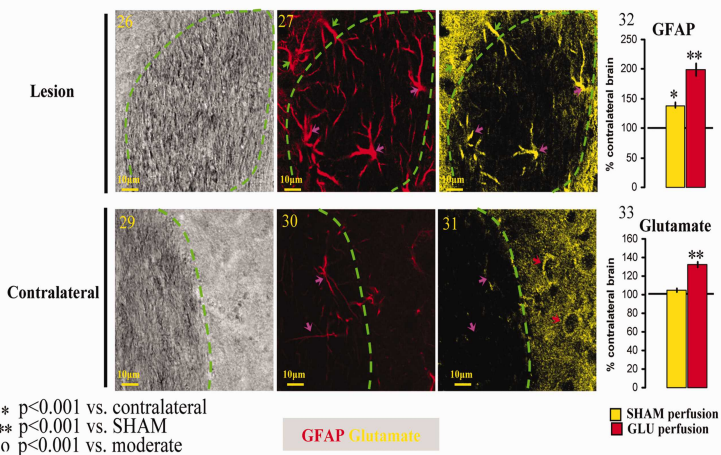
GLU-Administration Alters the GLU-Metabolism in Astrocytes

The GLU-transporter inhibition with PDC increased the extracellular concentration of GLU and decreased its astrocytic metabolites glutamine and alanine (Fig. 7 left-side). GLU-administration increased alanine (synthesized in astrocytes by catabolizing GLU with alanine aminotransferase) but decreased glutamine (synthesized in astrocytes by catabolizing GLU with glutamine synthetase). A similar effect was found when the glutamine synthetase was inhibited with MSO (Fig. 7 right-side). Thus, taken together, present data suggest that the GLU-administration increases the intracellular GLU, which, in a second step, produces a selective and persistent inhibition of glutamine synthetase (without changing the activity of alanine aminotransferase). This inhibition could be at the basis of the intracellular accu-

Protoplasmic astrocytes



Fibrous astrocytes



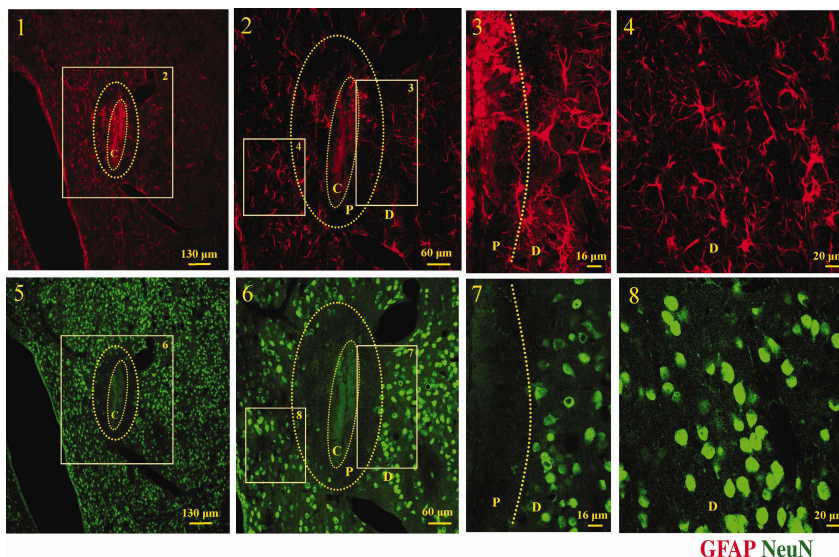


Fig. 5. Reactive gliosis and neuronal degeneration after GLU-perfusion: long-lasting effects. The cell immunoreactivity is shown in red for GFAP and green for NeuN. C: central region which was penetrated by the microdialysis probe. P: proximal region. D: distal region. Radial-like glia completely vanished six weeks after GLU-administration. The P region previously occupied by radial-like glia

was later replenished by protoplasmic astrocytes (1, 2, 3). Striatal parenchyma around the C region lost all its neurons (5, 6, 7). Protoplasmic astrocytes remained hypertrophic, and were located in both the P and D regions. No astrocytic differences were observed between the P and D regions (3 vs. 4). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

mulation of GLU in astrocytes, which cannot be metabolized in this way to glutamine and released to the extracellular medium by glutamine transporters.

microdialysis study showed the inhibition of glutamine synthetase as a possible cause for the astrocytic accumulation of GLU.

DISCUSSION

The transient administration of GLU in the striatum induced reactive astrogliosis with a persistent accumulation of GLU in reactive astrocytes. GLU-accumulation was found not only in protoplasmic and fibrous astrocytes but also in the radial-like glia, which appeared around the perfusion locus (an area which lost neuronal and astrocytic cell after GLU administration). The

The Extrasynaptic GLU-Pool Induces Cell Degeneration

GLU-perfusion induced the complete loss of protoplasmic astrocytes, fibrous astrocytes, and neurons in the striatal region bordering the perfusion area. This cell loss was observed in a radius of $\approx 400 \mu\text{m}$ around the microdialysis probe, suggesting that a high-GLU concentration is needed to induce cell death. The existence of

Fig. 4. Reactive gliosis and GLU-accumulation activated by GLU-perfusion: differences between perfused and contralateral striatum and between sham-perfused and GLU-perfused striatum. The cell immunoreactivity is shown in red for GFAP and yellow for glutamate. Black and white images show the striatal distribution of fiber tracts (black lines within the discontinuous green lines which indicate the tract boundary). C: central region which was penetrated by the microdialysis probe. P: proximal region showing radial (green arrows) and scar (yellow arrows) processes. D: distal region showing protoplasmic astrocytes and fibrous astrocytes (blue arrows). Protoplasmic astrocytes: green arrows. Radial-like astrocytes: pink arrows. Neuronal GLU-innervation: red arrows. Examples of high GFAP- and GLU-immunostaining are shown for protoplasmic astrocytes (top) and for fibrous astrocytes (bottom). GLU-perfusion induced a marked increase of GFAP-immunoreactivity in protoplasmic (8 vs. 9, and 10 vs. 11) and fibrous (27 vs. 30) astrocytes, an effect which was much more marked than that observed in sham-perfused rats (18 and 32). Both protoplasmic (14 vs. 15, and 16

vs. 17) and fibrous (28 vs. 31) astrocytes showed a marked GLU-immunoreactivity, an effect which was not observed in sham-perfused animals (19 and 33). The high GFAP and GLU immunostaining showed a marked colocalization in astrocytes (5). The GFAP (24) and GLU (25) immunoreactivity was more marked in regions with severe astrogliosis (characterized by a marked hypertrophy, GFAP up regulation and overlapping of astrocyte processes; 21 and 23) than in regions with moderate astrogliosis (characterized by a minor hypertrophy and GFAP up regulation which was not accompanied by an overlapping of astrocyte processes and a loss of the astrocytic cell domains; 20 and 22). Immunoreactivity values (immunofluorescence intensity) obtained in the injected striatum were normalized as a percentage of the mean value computed in the astrocytic processes of the contralateral striatum, a procedure used to minimize the intertrial fluctuation of immunostaining. Values represent the mean \pm standard error. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

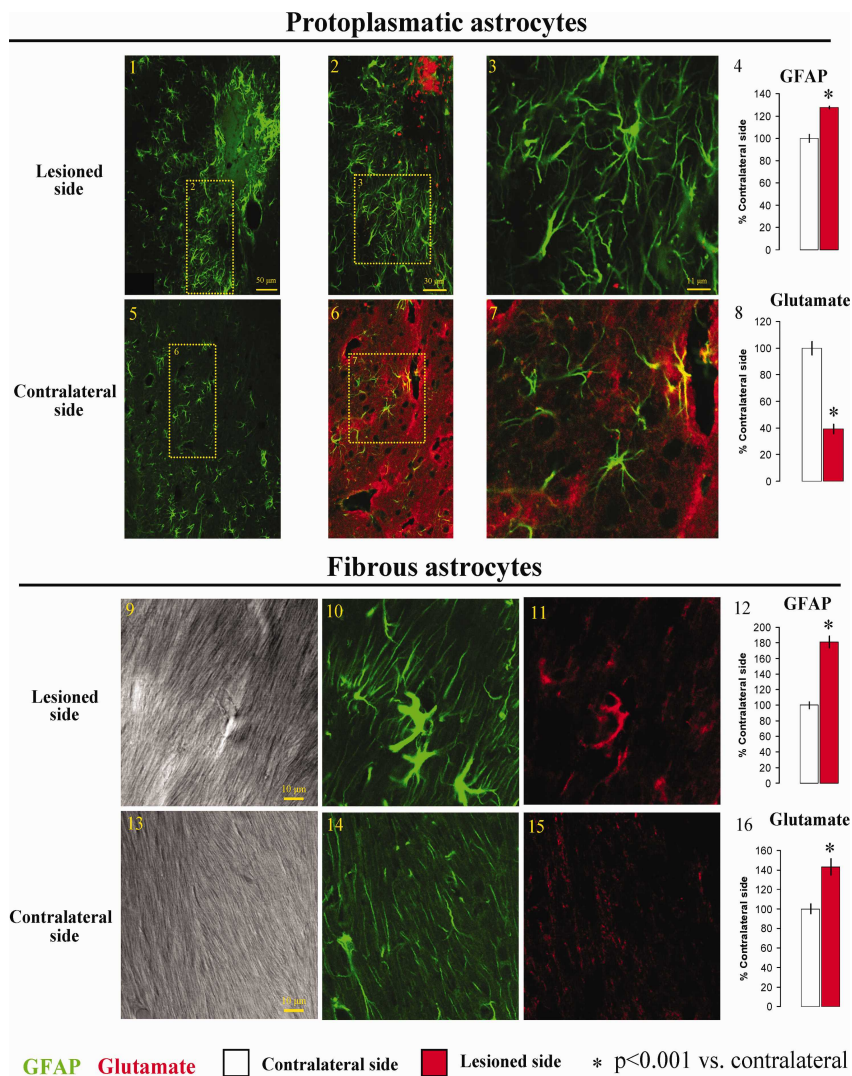


Fig. 6. Reactive gliosis and GLU-accumulation activated after GLU-perfusion: long-lasting effects. The cell immunoreactivity is shown in green for GFAP and in red for GLU. The black and white images show the striatal distribution of the fiber tracts. In protoplasmic astrocytes, the high GFAP-immunoreactivity persisted 6 weeks after GLU-administration (1 vs. 5; 2 vs. 6; 3 vs. 7; 4), but the GLU-immunoreactivity decreased to values below the contralateral striatum (8). In fibrous

astrocytes, the high GFAP (10 vs. 14; 12) and GLU (11 vs. 15; 16) immunoreactivity persisted 6 weeks after GLU-administration. Values are mean \pm standard error of immunofluorescence intensity; values were normalized as the percentage of the mean value of the contralateral striatum. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

two extracellular GLU-pools in the brain has been proposed: a neurotransmitter pool linked to the fast and short-lasting action of synaptic GLU on perisynaptic GLU-receptors and a volume transmitter pool linked to

the glial GLU which, after diffusing across the extracellular space, induces a long-lasting action on remote GLU-receptors (Bezzi et al., 2004; Del Arco et al., 2003; Keefe et al., 1993; Lowy et al., 1993; Salskaya and

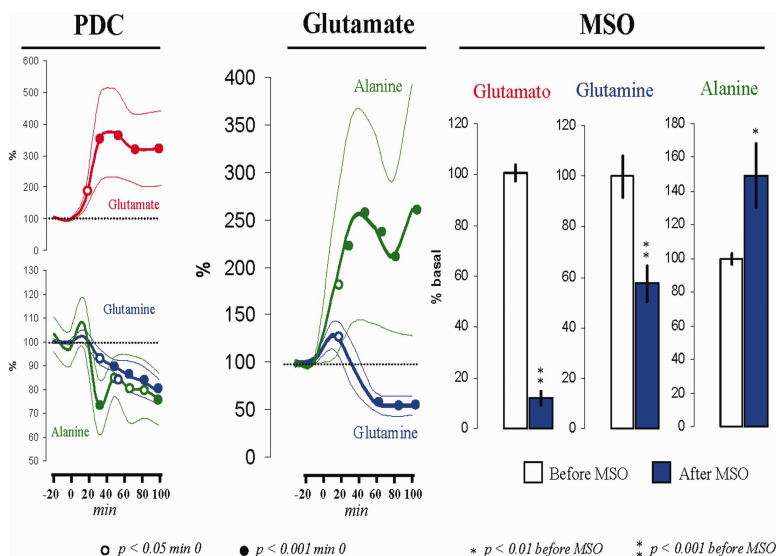


Fig. 7. Glutamate metabolism after PDC, MSO and glutamate administration: microdialysis study. Values were normalized according to the mean value in the three dialysates recorded before the drug perfusion and represent the mean \pm standard error. The GLU-transporter inhibition using PDC increased GLU and decreased glutamine and alanine (left-side). GLU-administration increased alanine and decreased

glutamine. The glutamine synthetase inhibition with MSO increased alanine and decreased glutamine and GLU (right-side). These data suggest that the glutamine synthetase inhibition is involved in the persistent GLU-accumulation observed in striatal astrocytes after the extracellular perfusion of GLU. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://www.interscience.wiley.com).]

Marsden, 1995; Shinohara et al., 2000; Tucci et al., 1998). The transfer-rate of drugs across the membrane of microdialysis probes (10%–15% when tested *in vitro* before each experiment) suggests that the perfusion of 5 mM GLU-solutions increased the extracellular GLU concentration up to 500 μ M, a concentration, which quickly decreased with GLU diffusion and under the action of GLU-transporters. This GLU-concentration is more than 10 times lower than that previously found in the synaptic cleft during neurotransmission (3–5 mM), but more than 100 times higher than that observed in the extrasynaptic space (1–2 μ M). Thus, perfused GLU was able to increase the nonsynaptic GLU-pool but not the synaptic GLU pool, suggesting that its actions on neurons and astrocytes probably involved GLU-receptors linked to the volume transmission more than those involved in neurotransmission.

GLU Induces Reactive Astrogliosis

The striatum around the microdialysis probe (P region) lost all its protoplasmic and fibrous astrocytes, which were replaced by GFAP+ cells not normally found in the striatum (radial-like astrocytes). These new cells had scar (forming a perilesion capsule) and radial processes similar to those previously reported for the radial glia in the subventricular zone (Garcia et al., 2004; Han-

sen et al., 2010; Scheffler et al., 2005; Suzuki and Goldman, 2003). Because the subventricular radial glia is GFAP+ (Doetsch et al., 1999; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Liu et al., 2006) and can migrate across the striatum (Behrstock et al., 2006; Zhang et al., 2007), these cells could be the origin of the perilesion radial-like glia found here. In addition, the subventricular radial glia can progress to fully differentiated astrocytes (Chojnacki and Weiss, 2008; Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Reynolds and Weiss, 1992), which could explain the tardy repopulation of the P region with new protoplasmic astrocytes (a fact observed here 5 weeks after GLU-administration).

The high GLU-level has been suggested as a cause of reactive astrogliosis (Sofroniew and Vinters, 2010), a possibility supported here for both protoplasmic and fibrous astrocytes. The intensity of the reactive gliosis decreased progressively in areas of the D region further away from the GLU-perfusion, suggesting that there is a direct relationship between the extracellular-GLU concentration and astrogliosis intensity. Near the perfusion area, the GLU action could have been intensified and prolonged by GLU released from synaptic terminals and glial cells which degenerated in the P region after GLU administration. The persistence of reactive gliosis was not the same in all the astrocyte types. The shortest response was found for radial-like glia, which was observed 1 week after GLU-perfusion but not 6 weeks

later. In contrast, the gliosis of protoplasmic astrocytes persisted for the 6 weeks of the study, replenishing the regions previously occupied by the perilesion radial-like glia during this time. Fibrous astrocytes were still activated at the end of the 6 weeks of the study.

The functional consequence of astrogliosis on the evolution of brain lesions is under debate (de Groot and Sontheimer, 2011; Raivich et al., 1999; Sofroniew and Vinters, 2010). The observation that glial scars inhibit axon regeneration initially suggested that astrogliosis is a maladaptive phenomenon, which was later reconsidered in studies reporting different beneficial effects for reactive astroglia (Sofroniew and Vinters, 2010). One of these beneficial functions is the ability of astroglial cells to uptake GLU and prevent its excitotoxic action (Bush et al., 1999; Rothstein et al., 1996; Swanson et al., 2004). A new fact to consider in this respect is the capability of these reactive astrocytes to accumulate GLU for long time-intervals.

Reactive Astrocytes Accumulate Intracellular-GLU

GLU perfusion for 1 h induced a marked accumulation of GLU in astrocytes which lasted for more than 6 weeks after the GLU withdrawal. As far as we know, this is the first time where a self-induced glutamate accumulation (SIGA) is reported in the striatum. Since SIGA was only observed in reactive astrocytes, present data also suggest a relationship between mechanisms involved in SIGA and those involved in the reactive gliosis.

The action of glial GLU transporters, and particularly of EAAT2, is probably required for SIGA. EAAT2 is very abundant in the brain (1% of total brain proteins) (Danbolt, 2001), and particularly in astrocytes (although it is also expressed by macrophages), where it acts as the agent primarily responsible for GLU removal from the extracellular medium (Foran and Trotti, 2009; Robinson, 1998). Thus, this transporter could be necessary for the initial accumulation of GLU in astrocytes and macrophages induced by GLU perfusion. However, the persistence of this accumulation for weeks is difficult to explain if the GLU-catabolization was normal. GLU-perfusion decreased the glutamine level, suggesting that the high concentrations of GLU can induce a fast blockade of glutamine synthesis. The GLU-administration which decreased the glutamine level increased the alanine level, suggesting that the inhibition of the GLU-catabolization is selective for glutamine synthetase and does not modify the activity of the alanine aminotransferase. This is also supported by the segregation of the glutamine (decrease) and alanine (increase) response to the inhibition of glutamine synthetase with MSO. The inhibition of GLU-transporters with PDC increased GLU but did not segregate the glutamine and alanine responses (both GLU-metabolites decreased). Taken together, the GLU increase and the alanine decrease observed after GLU administration suggests that high-GLU inhibits the glutamine synthetase without modify-

ing the activity of the alanine aminotransferase or the GLU-transporters. Considering the previous finding that astrogliosis downregulates the glutamine synthetase expression (Ortinski et al., 2010), present data showing that GLU inhibits the glutamine synthetase activity and only induces SIGA in reactive astrocytes suggest that the glutamine synthetase inhibition is a key factor for SIGA development.

As suggested in previous *in vitro* studies on hippocampal cells (Xu et al., 2007), the GLU-release from SIGA-astrocytes could induce a massive extracellular increase of GLU followed by excitotoxicity. The glial-GLU accumulation observed here could produce the same effects in the striatum, suggesting that SIGA is a maladaptive phenomenon. However, the production of an excessive quantity of glutamine can also damage neurons. It has been reported that glutamine can inhibit the metabolic activity of the mitochondria (Mates et al., 2009), promoting hepatic encephalopathy (Albrecht et al., 2007; Hourani et al., 1971; Lemberg and Fernandez, 2009). Thus, glutamine synthetase inhibition could also be an adaptive phenomenon to prevent glutamine toxicity. In any case, there are a number of stimuli (swelling, ischemia, ROS, microglia activation...) and mechanisms (vesicular release, reverse operation of GLU-transporters, opening of anion channels or hemichannels...) than can release GLU from the cytosol of astrocytes, and the massive storage of GLU for long-time intervals should be considered as a threat. The persistence of SIGA was different in protoplasmic and fibrous astrocytes. In fact, the SIGA observed in protoplasmic astrocytes one week after GLU-administration was replaced 6 weeks later by the contrary phenomenon, a decrease of GLU to levels lower than those computed in the contralateral striatum. As fibrous astrocytes showed SIGA at this tardy stage, this down-regulation was selective for protoplasmic astrocytes.

In summary, a complex reactive gliosis is reported here after the local perfusion of GLU in the extracellular medium of the striatum, a response which was different for radial-like glia, protoplasmic astrocytes, and fibrous astrocytes. Astrocytic gliosis was accompanied by a persistent cytosolic accumulation of GLU probably associated to a decrease of glutamine synthetase activity. GLUergic over-activation has been involved in the progression of degenerative disorders, such as HD and PD. This study shows that a transient over-activation of GLU-transmission can trigger a reactive astrogliosis which accumulates massive quantities of intracytosolic-GLU, and which could be involved in the progression of these basal ganglia disturbances.

REFERENCES

- Albin RL, Reiner A, Anderson KD, Dure LS, Handelin B, Balfour R, Whetsell WO Jr, Penney JB, Young AB. 1992. Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* 31:425-430.
- Albrecht J, Sonnevald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. 2007. Glutamine in the central nervous system: Function and dysfunction. *Front Biosci* 12:332-343.

- Andre VM, Cepeda C, Levine MS. 2010. Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci Ther* 16:163-178.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Beal MF, Kowall NW, Swartz KJ, Ferrante RJ, Martin JB. 1988. Systemic approaches to modifying quinolinic acid striatal lesions in rats. *J Neurosci* 8:3901-3908.
- Behrstock S, Ebert A, McHugh J, Vosberg S, Moore J, Schneider B, Capowski E, Hei D, Kordower J, Aebischer P, Svendsen CN. 2006. Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates. *Gene Ther* 13:379-388.
- Bezzi F, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzi BL, Pozzan T, Volterra A. 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Bezzi F, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613-620.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostendorf T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297-308.
- Coyle JT. 1987. Kainic acid: Insights into excitatory mechanisms causing selective neuronal degeneration. *Ciba Found Symp* 126:186-203.
- Coyle JT, Schwarcz R. 1976. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263:244-246.
- Chojnacki A, Weiss S. 2008. Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells. *Nat Protoc* 3:935-940.
- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- de Groot J, Sontheimer H. 2011. Glutamate and the biology of gliomas. *Glia* 59:1181-1189.
- Del Arco A, Segovia G, Fuxe K, Mora F. 2003. Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: An index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem* 85:23-33.
- Doetsch F, Caille L, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Douaud G, Behrens TE, Poupon C, Cointepas Y, Jbabdi S, Gaura V, Gholstani N, Krystkowiak P, Verny C, Damier P, Bachoud-Lévi AC, Hantraye P, Remy P. 2009. In vivo evidence for the selective subcortical degeneration in Huntington's disease. *Neuroimage* 46:958-966.
- During MJ, Ryder KM, Spencer DD. 1995. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature* 376:174-177.
- Foran E, Trotti D. 2009. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* 11:1587-1602.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Garcia Dopic J, Perdomo Diaz J, Alonso TJ, Gonzalez Hernandez T, Castro Fuentes R, Rodriguez Diaz M. 2004. Extracellular taurine in the substantia nigra: taurine-glutamate interaction. *J Neurosci Res* 76:528-538.
- Haas J, Erdö SL. 1991. Quisqualate-induced excitotoxic death of glial cells: transient vulnerability of cultured astrocytes. *Glia* 4:111-114.
- Halliday GM, Stevens CH. 2011. Glia: Initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:6-17.
- Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR. 2010. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464:554-561.
- Hazell AS. 2007. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int* 50:941-953.
- Hourani BT, Hamlin EM, Reynolds TB. 1971. Cerebrospinal fluid glutamine as a measure of hepatic encephalopathy. *Arch Intern Med* 127:1033-1036.
- Jenner P, Olanow CW. 1998. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44:S72-S84.
- Kassubek J, Juengling FD, Ecker D, Landwehrmeyer GB. 2005. Thalamic atrophy in Huntington's disease co-varies with cognitive performance: A morphometric MRI analysis. *Cereb Cortex* 15:846-853.
- Keefe KA, Sved AF, Zigmund MJ, Abercrombie ED. 1993. Stress-induced dopamine release in the neostriatum: Evaluation of the role of action potentials in nigrostriatal dopamine neurons or local initiation by endogenous excitatory amino acids. *J Neurochem* 61:1943-1952.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-184.
- Lemberg A, Fernandez MA. 2009. Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Ann Hepatol* 8:95-102.
- Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A. 2006. GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia* 54:394-410.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2074-2077.
- Lowy MT, Gault L, Yamamoto BK. 1993. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem* 61:1957-1960.
- Marcaggi P, Attwell D. 2004. Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. *Glia* 47:217-225.
- Marti M, Sbrenna S, Fuxe K, Bianchi C, Beani L, Morari M. 2000. Increased responsiveness of glutamate release from the substantia nigra pars reticulata to striatal NMDA receptor blockade in a model of Parkinson's disease. A dual probe microdialysis study in hemiparkinsonian rats. *Eur J Neurosci* 12:1848-1850.
- Mates JM, Segura JA, Campos-Sandoval JA, Lobo C, Alonso L, Alonso FJ, Marquez J. 2009. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2051-2061.
- Matute C. 1998. Characteristics of acute and chronic kainate excitotoxic damage to the optic nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10229-10234.
- Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV. 2006. Glutamate-mediated glial injury: Mechanisms and clinical importance. *Glia* 53:212-224.
- McCarty MF. 2006. Down-regulation of microglial activation may represent a practical strategy for combating neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses* 67:251-269.
- McDonald JW, Althomson SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP. 1998. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med* 4:291-297.
- McGeer EG, McGeer PL, Singh K. 1978. Kainate-induced degeneration of neostriatal neurons: Dependency upon corticostriatal tract. *Brain Res* 139:381-383.
- McGeer PL, McGeer EG. 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:474-483.
- Meshul CK, Emre N, Nakamura CM, Allen C, Donohue MK, Buckman JF. 1999. Time-dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 88:1-16.
- Morales I, Fuentes A, Gonzalez-Hernandez T, Rodriguez M. 2009. Osmosensitive response of glutamate in the substantia nigra. *Exp Neurol* 220:335-340.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. 2008. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 Suppl 3:S548-S559.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G. 2010. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med* 16:653-661.
- O'Brien TP, Richards DA. 1995. Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 7:1-54.
- O'Brien TP, Urenjak J. 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: From high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog Neurobiol* 51:39-87.
- Olanow CW, Tatton WG. 1999. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 22:123-144.
- Ortinski PI, Dong J, Mungenast A, Yue C, Takano H, Watson DJ, Haydon PG, Coulter DA. 2010. Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nat Neurosci* 13:584-591.
- Perry VH, Bell MD, Brown HC, Matsysak MK. 1995. Inflammation in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5:636-641.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.
- Rappold PM, Tieu K. 2010. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 7:413-423.
- Reynolds BA, Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Robinson MB. 1998. The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAT2 subtype. *Neurochem Int* 33:479-491.
- Rodriguez Diaz M, Alonso TJ, Perdomo Diaz J, Gonzalez Hernandez T, Castro Fuentes R, Sabate M, Garcia Dopic J. 2005. Glial regulation of nonsynaptic extracellular glutamate in the substantia nigra. *Glia* 49:134-142.
- Rodriguez M, Morales I, Gomez I, Gonzalez S, Gonzalez-Hernandez T, Gonzalez-Mora JL. 2006. Heterogeneous dopamine neurochemistry in the striatum: the fountain-drain matrix. *J Pharmacol Exp Ther*.

- Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW. 1998. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol* 44:S175-S188.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty Df. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Saulskaya N, Marsden CA. 1995. Extracellular glutamate in the nucleus accumbens during a conditioned emotional response in the rat. *Brain Res* 698:114-120.
- Scheffler B, Walton NM, Lin DD, Goetz AK, Enikolopov G, Roper SN, Steindler DA. 2005. Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9353-9358.
- Shinohara K, Honma S, Katsuno Y, Honma K. 2000. Circadian release of excitatory amino acids in the suprachiasmatic nucleus culture is Ca(2+)-independent. *Neurosci Res* 36:245-250.
- Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638-647.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-581.
- Suzuki SO, Goldman JE. 2003. Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: A dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J Neurosci* 23:4240-4250.
- Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4:193-205.
- Teismann P, Schulz JB. 2004. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res* 318:149-161.
- Tucci S, Rada P, Hernandez L. 1998. Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain Res* 813:44-49.
- Vesce S, Rossi D, Brambilla L, Volterra A. 2007. Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol* 82:57-71.
- Xu J, Peng H, Kang N, Zhao Z, Lin JH, Stanton PK, Kang J. 2007. Glutamate-induced exocytosis of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem* 282:24185-24197.
- Yoshioka A, Hardy M, Younkin DP, Grinspan JB, Stern JL, Pleasure D. 1995. Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors mediate excitotoxicity in the oligodendroglial lineage. *J Neurochem* 64:2442-2448.
- Zhang RL, LeTourneau Y, Gregg SR, Wang Y, Toh Y, Robin AM, Zhang ZG, Chopp M. 2007. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: A study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J Neurosci* 27:3157-3162.