



**Cinvestav**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

***“PAPEL DEL RECEPTOR D4 EN EL PARKINSON  
EXPERIMENTAL Y EL TRATAMIENTO CON L-DOPA”***

**T E S I S**

**Que presenta**

**MARINA RODRÍGUEZ SÁNCHEZ**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN FARMACOLOGÍA**

**Director de tesis: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO**

**México, D.F.**

**Diciembre de 2012**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio # 4 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del D.C Benjamín Florán Garduño y con el proyecto financiado por CONACYT No. 152326.

***Nuestra naturaleza esta en movimiento.  
El reposo absoluto es la muerte.***

*Blaise Pascal*

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	A
<b>Resumen</b> .....	B
<b>1. Introducción</b> .....	10
1.1 Ganglios basales.....	10
1.1.1 Núcleo Estriado.....	10
1.1.2 Globo pálido.....	11
1.1.3 Núcleo subtalámico.....	11
1.1.4 Sustancia Nigra.....	12
1.1.5 Circuito de los ganglios basales.....	13
1.2 Dopamina.....	14
1.2.1 Receptores a dopamina.....	16
1.3 Enfermedad de Parkinson.....	22
1.4 Patogénesis de las discinesias inducidas por L-dopa.....	25
<b>2. Justificación</b> .....	28
<b>3. Hipótesis</b> .....	28
<b>4. Objetivos</b> .....	29
4.1 Objetivos particulares.....	29
<b>5. Materiales y Métodos</b> .....	29
5.1 Animales.....	29
5.2 Lesión con 6-hidroxidopamina.....	29
5.3 Conducta de giro.....	30
5.4 Tratamiento con L-dopa y L-745870.....	30
5.5 Evaluación conductual de discinesias.....	31
5.6 Prueba del cilindro.....	33
5.8 Soluciones Utilizadas.....	33
5.9 Análisis estadístico.....	34

## ÍNDICE

<b>6. Resultados</b> .....	35
6.1 Activación del receptor D4 durante el tratamiento con L-dopa.....	35
6.2 Efecto del tratamiento crónico con dosis subterapéuticas de L-dopa y el antagonista del receptor D4 L-745,870 sobre el índice de asimetría.....	36
6.3 Efecto del tratamiento crónico con dosis subterapéuticas de L-dopa y el antagonista del receptor D4 L-745,870 sobre la incidencia de discinesias.....	39
6.4 Efecto del tratamiento crónico con dosis subterapéuticas de L-dopa y el antagonista del receptor D4 L-745,870 sobre el puntaje de discinesias.....	40
6.4.1 Discinesia axial.....	42
6.4.2 Discinesia orolingual.....	43
6.4.3 Discinesia de extremidades.....	44
<b>7. Discusión</b> .....	46
7.1 Activación de los receptores D4 durante el tratamiento con L-dopa.....	46
7.2 Efecto terapéutico del tratamiento crónico de dosis subterapéuticas de L-dopa en conjunto con el antagonista selectivo de los receptores D4 L-745,870.....	48
7.3 Efecto del tratamiento crónico de dosis subterapéuticas de L-dopa en conjunto con el antagonista selectivo de los receptores D4 L-745,870 sobre las discinesias inducidas y su incidencia.....	50
7.4 Papel de receptor D4 en el tratamiento con L-dopa.....	52
<b>8. Conclusiones</b> .....	54
<b>9. Bibliografía</b> .....	55

## ABREVIATURAS

**GPI** *Globo Pálido interno*

**GPe** *Globo Pálido externo*

**NST** *Núcleo Subtlámico*

**SNr** *Sustancia Nigra reticulata*

**SNC** *Sustancia Nigra compacta*

**GABA** *Ácido Gamma Amino Butírico*

**SP** *Sustancia P*

**TH** *Tirosina Hidroxilasa*

**DCAA** *Descarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos*

**SNC** *Sistema Nervioso Central*

**GPCR** *Receptor acoplado a Proteínas G*

**AC** *Adenilato Ciclasa*

**AMPc** *Adenosin monofosfato cíclico*

**PKA** *Proteín Cinasa regulada A*

**NMDA** *Ácido N-metil D-aspartico*

**DARPP-32** *Fosofoproteína regulada por dopamina y AMPc de 32 kD*

**PP1** *Proteín fosfatasa 1*

**PLC** *Fosfolipasa C*

**IP3** *Inositol trifosfato*

**DRD4** *Receptor a dopamina D4*

**VNTR** *Número Variable de Repeticiones en Tandem*

**Kd** *Constante de disociación*

**EP** *Enfermedad de Parkinson*

**6-OHDA** *6-Hidroxidopamina*

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

**COMT** *Catecol-O-metiltransferasa*

**MAO-B** *Monoamin oxidasa B*

**ERK 1/2** *Cinasa regulada por señal extracelular 1 y 2*

**MAPK** *Proteín Cinasa activada por mitógeno*

**GAD** *Glutamato descarboxilasa*

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un proceso crónico y progresivo causado por la degeneración neuronal de la sustancia nigra compacta (SNc), lo que lleva a trastornos en el movimiento por un decremento en los niveles de dopamina, principal regulador de los sistemas motores. El complejo de núcleos de los ganglios basales está encargado de modular el movimiento y está dividido funcionalmente en dos vías: la vía directa, envía la información del núcleo de entrada (estriado) al núcleo de salida (SNr) y en la vía indirecta la información fluye del núcleo de entrada hacia el GPe y NST antes de llegar al núcleo de salida (SNr) que manda información al Tálamo y este a la corteza. En la EP la deficiencia de dopamina lleva al remodelamiento funcional de los ganglios basales, la alteración mas importante afecta al núcleo de salida (SNr), el globo pálido externo (GPe); los cuales tienen una actividad incrementada.

El tratamiento de elección para la EP es la L-DOPA, a pesar de modular nuevamente ambas vías y generar un efecto terapéutico adecuado reflejado en la correcta ejecución del movimiento, la L-DOPA tiene como principal efecto adverso las discinesias (movimientos involuntarios anormales). En terminales estriado-nigrales de ratas denervadas con 6-Hidroxidopamina que presentan discinesias severas a causa del tratamiento con el L DOPA, se ha observado un incremento en la señalización del receptor D1 siendo responsable la adenilil ciclasa presente en dicha vía, encontrándose esta en mayor cantidad y con una actividad aumentada, tal suceso provoca una liberación masiva de GABA a nivel de la SNr y produce así anomalías en el movimiento voluntario del individuo.

Un elemento a considerar es el receptor D4, ya que según reportes de Acosta en 2009 se encuentra localizado en los ganglios basales en las terminales pálido nigrales funcionando como un inhibidor de la liberación de GABA en dichas proyecciones.

Considerando lo anterior y que las discinesias son causadas por un incremento en la liberación masiva de GABA en la vía directa, al incrementarse los niveles de dopamina por el tratamiento con L-DOPA a nivel de la SNr se produce una estimulación de los receptores D4 pálido-nigrales lo que inhibiría la liberación de GABA a ese nivel, el bloqueo de dichos receptores puede representar una opción terapéutica para disminuir las discinesias a causa de la estimulación de la vía directa, favoreciendo la liberación de GABA de terminales pálido-nigrales, considerando también que se administre una dosis de L-DOPA menor, con lo que se espera un efecto terapéutico adecuado y una disminución en el efecto adverso principal: las discinesias.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a chronic and progressive caused by the neuronal degeneration of substantia nigra compacta (SNc), leading to movement disorders by a decrease in the levels of dopamine, the main regulator of motor systems . The complex of nuclei in the basal ganglia is designed to vary the movement and is functionally divided into two pathways: a direct path, sends information input core (striatum) to the output core (SNr) and in the indirect route the information input flows from the core to the GPe and NST before reaching the output core (SNr) that sends this information to the thalamus and the cortex. In EP dopamine deficiency leads to the functional remodeling of the basal ganglia, the most important alteration affects the output core (SNr), external globus pallidus (GPe), which have an increased activity.

The treatment of choice for PD is L-DOPA, although again both pathways modulate and generate an adequate therapeutic effect reflected in the proper execution of the movement, the L-DOPA's main adverse dyskinesias (abnormal involuntary movements). Striato-nigral terminals in denervated rats with 6-hydroxydopamine shown severe dyskinesias that occur due to the treatment with L-DOPA, there has been an increase in the D1 receptor signaling adenyl cyclase responsible being present in said track, being this in greater amount and with an increased activity, such an event causes a massive release of GABA level of SNr and thus produces abnormalities in the voluntary movement.

A major factor is the D4 receptor, since according to Acosta reports in 2009 is located in the basal ganglia in pallido-nigral terminals function as an inhibitor of GABA release in these projections.

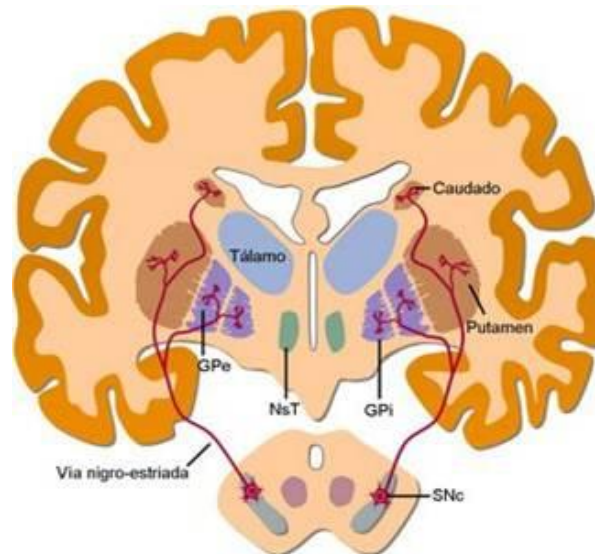
Considering the above and dyskinesias are caused by a massive increase in the release of GABA in the direct path, by increasing dopamine levels by treatment with L-DOPA in the SNr occurs D4 receptor stimulation located in pallido-nigral terminals which inhibit GABA release at that level, blocking these receptors may represent a therapeutic option for reducing dyskinesias due to stimulation of the direct pathway, favoring the release of GABA pallido-nigral terminals, considering also is administered a dose of L-DOPA lower, which is expected adequate therapeutic effect and a decrease in the main adverse effect: dyskinesias.



## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1 Ganglios Basales

Entre las funciones más importantes del Sistema Nervioso Central se encuentra el movimiento voluntario, que es regulado por diversas estructuras entre ellas los Ganglios Basales conformados por el Núcleo Estriado en sus porciones Caudado y Putamen, el Globo pálido interno o medial (GPi) y externo (GPe), y el Núcleo Subtalámico (NST), los anteriores localizados en el telencéfalo (la localización de dichos núcleos es ilustrada en la figura 1). Finalmente la Sustancia Nigra Reticulada (SNr) y Compacta (SNc) estas localizadas en el mesencéfalo. La funcionalidad de estos núcleos es complementada por el Tálamo y la Corteza.



**Fig. 1** Ubicación anatómica de los Ganglios Basales. El Núcleo Estriado y Globo pálido localizados en el telencéfalo, el Núcleo Subtalámico en el di encéfalo y la Sustancia Nigra en el mesencéfalo.

#### 1.1.1 Núcleo Estriado

La mayoría de las neuronas que conforman el Núcleo Estriado utilizan como neurotransmisor GABA (ácido gama amino butírico), aproximadamente el 95% de las neuronas son de proyección y además de tener una morfología similar, son denominadas espinosas medianas. Por otra parte el 5% restante de células corresponde a interneuronas Colinérgicas y GABAérgicas.

Las neuronas espinosas medianas del Núcleo Estriado se dividen en dos poblaciones de acuerdo al núcleo a donde proyectan sus axones y a la sustancia que co-liberan además de GABA. Las neuronas que proyectan hacia la SNr co-liberan sustancia P (SP) ó dinorfina, estas neuronas forman lo que se denomina vía directa en los Ganglios Basales, el grupo neuronal restante proyecta sus axones hacia el Globo pálido y co-libera encefalinas, este grupo neuronal forma la vía indirecta en el circuito de los Ganglios Basales.

### **1.1.2 Globo pálido**

El Globo pálido recibe su nombre de sus axones bien mielinizados, sus neuronas utilizan GABA como neurotransmisor y está localizado junto al Putamen del Estriado para conformar el Núcleo Lenticular. La mayoría de sus aferencias GABAérgicas provienen de las porciones Caudado y Putamen del Núcleo Estriado de donde reciben información para transmitirla hacia el Tálamo. El Globo pálido recibe inervación glutamatérgica proveniente del Núcleo Subtalámico y dopaminérgica de la SNc (Debeir 2005). El GP se divide en dos poblaciones neuronales, una medial o interna GPi que forma parte de los núcleos de salida de información en el circuito de los Ganglios Basales, dicho núcleo (GPi) envía también axones hacia el Tálamo (Smith y Bolam 2000). Por otro lado la porción dorsal o externa del Globo pálido (GPe) proyecta axones de naturaleza GABAérgica hacia el Núcleo Reticular del Tálamo, Núcleo Subtalámico y Sustancia Nigra Reticulada.

### **1.1.3 Núcleo subtalámico**

El NST esta conformado por neuronas piramidales alargadas que utilizan glutamato como neurotransmisor (Parent 1988, Lee 2004), esta localizado en la parte inferior del Tálamo, las proyecciones aferentes GABAérgicas principales para este núcleo son provenientes del GPe (Shink 1996), glutamatérgicas de varias áreas motoras de la corteza (Maurice 1998), y dopaminérgicas de la SNc (Wichman 2008).

Los axones del NST proyectan hacia el complejo GPi/SNr donde se procesa la información proveniente de las vías directa e indirecta generadas en el circuito de los Ganglios Basales.

#### **1.1.4 Sustancia Nigra**

La Sustancia Nigra es un conjunto de neuronas divididas en dos poblaciones anatómica y funcionalmente distintas. La Sustancia Nigra Compacta es densamente poblada y utiliza dopamina como neurotransmisor, por su parte la población de la Sustancia Nigra Reticulada de naturaleza GABAérgica cuenta con un número menor de neuronas.

- *Sustancia Nigra Compacta SNC.*

Las neuronas de este núcleo tienen proyecciones al Núcleo Estriado, Globo pálido externo e interno y al Núcleo Subtalámico. Por otra parte recibe inervación GABAérgica del Núcleo Estriado y Globo pálido, Glutamatérgica del Núcleo Subtalámico y del Núcleo Pendunculopontino (Bezard y Gross 1998).

- *Sustancia Nigra Reticulada SNr.*

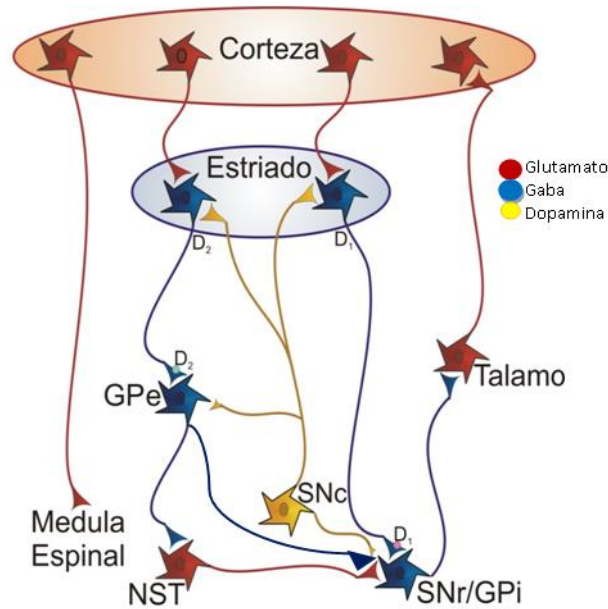
Este núcleo es de suma importancia ya que esta involucrado en la integración de la información procesada en el circuito de los ganglios basales al modular un movimiento. Las neuronas de este núcleo son de origen GABAérgico, estas reciben proyecciones GABAérgicas de Globo pálido externo y del Núcleo Estriado así como también proyecciones glutamatérgicas del NST. Las neuronas de la SNr envían proyecciones axonales a la SNC, Tálamo, Tronco encefálico y Colículo superior, todas las mencionadas involucradas con la generación de movimiento (Bolam 2000).

### **1.1.5 Circuito de los Ganglios Basales**

En el momento en que un individuo quiere realizar un movimiento el circuito de los Ganglios Basales entra en acción de tal forma que la Corteza comienza a enviar señales excitatorias hacia el núcleo de entrada de información del circuito: el Núcleo Estriado, esto con el fin de modular finamente el movimiento a realizar. La excitación del núcleo de entrada mediante señales glutamatérgicas provenientes de la Corteza permite la activación de las dos poblaciones neuronales existentes en el Núcleo Estriado, las cuales se generan dos vías en este circuito (Ver figura 2).

La vía directa conformada por neuronas que liberan GABA y SP, se activan de tal forma que aumenta la liberación de GABA permitiendo de una manera directa la inhibición del complejo de salida SNr/GPi de tal forma que el Tálamo con su actividad autónoma se encuentra libre para excitar a las neuronas de la Corteza facilitando así la ejecución del movimiento. Actualmente se sabe de la existencia de receptores a dopamina D1 presentes en el soma y las terminales estriado-nigrales los cuales modulan la liberación de GABA proveniente del Núcleo Estriado, estos receptores acoplados a proteínas G estimuladoras favorecen aun más la liberación del neurotransmisor de tal forma que se incrementa la inhibición de los núcleos de salida y se favorece el movimiento.

La vía indirecta por su parte procesa la información desde neuronas que co-liberan encefalinas y GABA, estas neuronas al excitarse promueven la liberación de GABA, este fenómeno se ve prevenido por acción de receptores a dopamina D2 expresados diferencialmente en estas neuronas, dichos receptores acoplados a proteínas G inhibitorias al activarse por dopamina inhiben la liberación de GABA en el primer núcleo de relevo de esta vía que es el GPe.



**Figura 2.** Esquema representativo de la organización funcional del circuito de los ganglios basales. La vía directa expresan de forma diferencial el receptor D1 y la vía indirecta al receptor D2.

La liberación considerablemente disminuida de la neuronas estriatales permiten que la población neuronal del Pálido externo se encuentre más activa, liberando así GABA en el NST inhibiendo de esta forma su actividad excitatoria sobre el complejo de salida del circuito SNr/GPi, dejando libre al Tálamo para excitar a la Corteza y esta a su vez a la Medula Espinal facilitando el movimiento del individuo.

Ambas vías promueven un efecto sinérgico sobre la facilitación del movimiento, dicha función se lleva a cabo a través de la modulación en los diferentes receptores estratégicamente localizados en este circuito sensibles a dopamina.

### **1.2 Dopamina**

La dopamina es una hormona y neurotransmisor producido en una gran variedad de seres vivos. La síntesis de dopamina ilustrada en la figura 3 se lleva a cabo por la hidroxilación del aminoácido tirosina a través de la tirosina hidroxilasa (TH) convirtiéndolo en L-dopa, misma que es descarboxilada por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DCAA) produciendo así dopamina.

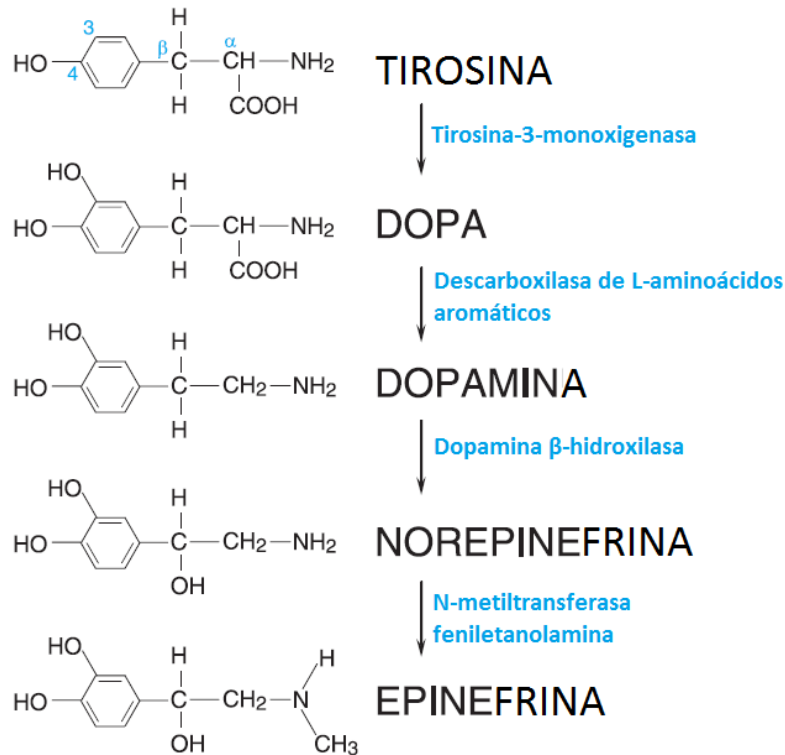


Figura 3. Síntesis de dopamina. El aminoácido tirosina es hidroxilado mediante la Tirosina hidroxilasa para convertirse en dopa, mediante la Descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos la Dopa es transformada a Dopamina.

En el cerebro de mamíferos se tienen datos de que las inervaciones dopaminérgicas son las más prominentes con respecto a poblaciones neuronales de otra naturaleza. Existen cuatro vías dopaminérgicas principales identificadas hasta el momento en mamíferos: la vía estriado-nigral, la vía mesocortical, la vía mesolímbica y la vía tuberoinfundibular, siendo la vía estriado-nigral la relacionada en la generación de movimiento.

Esta catecolamina regula importantes funciones en el Sistema Nervioso Central, por ejemplo: movimiento voluntario, alimentación, afecto, recompensa, sueño, atención, memoria de trabajo y aprendizaje. A nivel periférico la dopamina también tiene funciones importantes como: regulación del olfato, procesos de retina, regulación hormonal, funciones vasculares, sistema inmune y funciones renales (Snyder 1970, Missale 1998, Sibley 1999, Carlsson 2001, Iversen 2007).

En el Sistema Nervioso Central existen tres fuentes principales de producción de dopamina, en primera instancia el Área Ventral Tegmental que proyecta sus axones hacia el Sistema Límbico, Núcleo Acumbens y algunas zonas de la Corteza; estas áreas involucradas en emociones y cognición principalmente.

Otra área involucrada en la producción de dopamina es el Núcleo Arqueado que inerva a la Glándula pituitaria y por último pero no menos importante la Sustancia Nigra Compacta que provee de dopamina a los Ganglios Basales para la modulación del movimiento voluntario.

### 1.2.1 Receptores a dopamina

Las acciones fisiológicas de la dopamina están relacionadas con cinco distintos pero estrechamente relacionados receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que se dividen en dos familias; la familia del tipo D1 y la familia tipo D2 (Vallone 2000). Esta clasificación se basa en las observaciones bioquímicas originales que muestran que la dopamina es capaz de modular la actividad de la adenilato ciclasa (AC). Posteriormente un enfoque genético permitió clonar cada uno de estos receptores activados por dopamina y agruparlos en las mencionadas familias (Van Tol 1991) (Ver Figura 4).

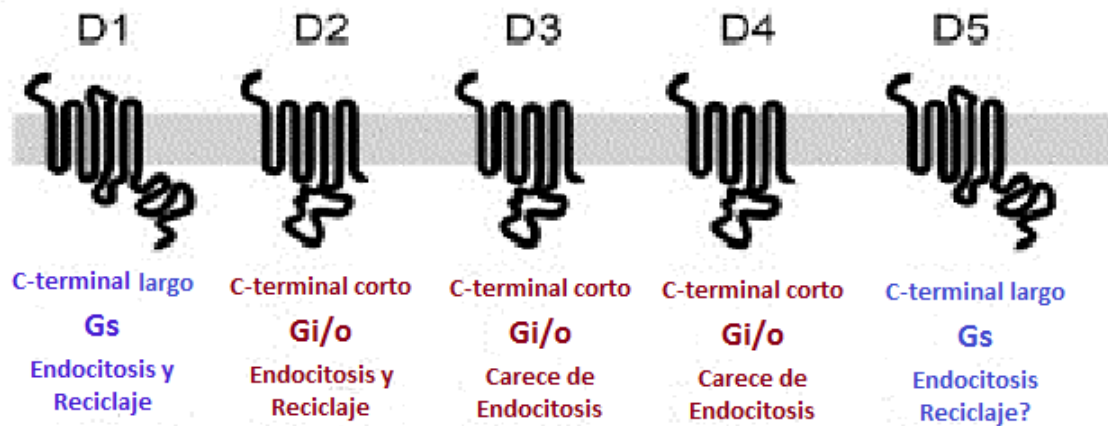


Figura 4. Receptores a dopamina. La familia tipo D1 conformada por el receptor D1 y D5, receptores acoplados a proteínas G estimuladoras. La familia tipo D2 integrada por D2, D3 y D4 acoplados a proteínas G inhibitorias.

- **Familia tipo D1**

Esta familia de receptores esta conformada por el receptor D1 y D5, de los cuales se sabe tienen alta homología en sus dominios transmembranales, también que estos receptores activan a proteína G de tipo  $G\alpha_{s/olf}$  para estimular la producción de Adenosina monofosfato cíclico (AMPC) por la AC, y que se encuentran por lo general post-sinápticamente en neuronas que reciben dopamina por ejemplo, las neuronas espinosas medianas del Núcleo Estriado (Sokoloff 2006, Rankin 2010, Rondou 2010).

- a) Receptor D1**

Este receptor cuenta con 466 aminoácidos, tiene una expresión bien localizada en el Sistema Nervioso Central, se ha encontrado en el Núcleo Estriado, Sustancia Nigra, Corteza, Tubérculo Olfatorio y Núcleo Acumbens; también se ha localizado aunque con menor expresión en Cerebelo, Hipocampo, Hipotálamo y Tálamo (Caron 1993, Rankin 2010).

Entre las funciones de este receptor localizado post-sinápticamente en neuronas de la vía directa en el circuito de los Ganglios Basales ha sido bien caracterizado que su activación tiene un efecto estimulador sobre la actividad locomotora en varios modelos animales.

La estimulación del receptor D1 lleva a la activación de la proteína  $G\alpha_{s/olf}$  la cual produce que la AC incremente su actividad para producir AMPC. Este mensajero secundario produce la activación de la Proteína Kinasa A (PKA), la cual tiene diversos blancos como, inhibición de canales de sodio, inhibición de canales de potasio dependientes de voltaje, inhibición de canales rectificadores de corrientes entrantes de potasio, estimulación de canales de calcio tipo L, N, P, Q, NMDA y GABA (Neve 2004). PKA también fosforila a DARPP-32 que funge como un inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Flores-Hernández 2002).



Por otra parte se ha demostrado también que los receptores D1 pueden acoplarse también a proteínas  $G\alpha_q$ , esto en presencia de proteínas adaptadoras como calcyon, esto lleva a la hidrólisis de fosfo-inosítidos por activación de la Fosfolipasa C (PLC), dando lugar a la producción de inositol-3-fosfato (IP3) y diaciglicerol, esto produce la activación de receptores a IP3 en el retículo endoplásmico y la liberación de calcio del depósito intracelular (Lezcano 2000).

### ***b) Receptor D5***

La estimulación de este receptor provoca la activación de proteínas  $G\alpha_s$ , la generación de AMPc y la activación de la PKA. Este receptor se ha localizado en el Sistema Nervioso Central, a nivel del Hipotálamo, Núcleo Estriado, Corteza, Núcleo Accumbens y Tubérculo olfatorio. Se sabe también que esta proteína de 477 aminoácidos tiene una homología del 80 % con el receptor D1 y que tiene 10 veces menor afinidad por la dopamina que este. Con respecto a su funcionalidad es poca la información, debido a su localización en los Ganglios Basales es posible que este modulando la actividad locomotora de una forma fina, al igual que los receptores D3 y D4.

- ***Familia tipo D2***

Esta familia de receptores esta conformada por los subtipo D2, D3 y D4. Los subtipos D2 y D3 tienen una homología del 75% en sus dominios transmembranales, por su parte D2 y D4 tienen 53% de homología (Missale 1998). Los receptores de esta familia tienen un asa intracelular de mayor tamaño en comparación con los receptores de tipo D1, característica común de receptores que se acoplan con proteínas  $G\alpha_i$ . Los receptores de esta familia se acoplan a  $G\alpha_i$  por lo que disminuyen la actividad de Adenilato Ciclasa produciendo la inhibición de la formación del segundo mensajero AMPc; estos receptores activan canales de potasio e inhiben canales de calcio.

### **a) Receptor D2**

El receptor D2 tiene dos isoformas que se generan por splicing alternativo, la isoforma corta ó S y la isoforma larga L. Estas variantes del receptor D2 tiene distintas características anatómicas, fisiológicas, farmacológicas y de señalización. La forma corta D2S se expresa generalmente a nivel presináptico y se sabe que esta mayormente envuelta en funciones de autorreceptor, por su parte la forma larga D2L presenta de manera post-sináptica (Usiello 2000, De Mei 2009).

El receptor D2 se encuentra mayormente expresado en el Núcleo Estriado, Accumbens y Tubérculo olfatorio. Una característica muy particular de estos receptores es su localización en neuronas estriado-palidales, donde inhiben la liberación de GABA, este fenómeno se refleja a nivel funcional ya que al activarlos se favorecen el incremento de la actividad locomotora en modelos animales sinergizando el efecto de la vía directa del circuito de los ganglios basales.

### **b) Receptor D3**

Este receptor acoplado a proteínas G inhibitorias es expresado en el SNC en el Núcleo Accumbens, Islas de calleja, Pálido ventral, Cerebelo y Núcleo Estriado. A niveles significativamente más bajos el receptor D3 es detectable en la Sustancia Nigra Compacta, el Área Ventral Tegmental, Hipocampo, el área septal y Corteza.

Existe evidencia farmacológica a partir de los estudios genéticos en ratones knock-out de receptores de dopamina D3, que sugiere que estos pueden contribuir a la regulación de liberación tónica de dopamina, complementando así el papel de la autorreceptor D2S en la regulación de la tasa de activación neuronal, la síntesis de la dopamina, y su liberación fásica (De Mei 2009, Shippenberg 2002, Sibley 1999, Joseph 2002). Los receptores D3 parecen ejercer un papel inhibitorio moderado sobre la actividad locomotora.

### **c) Receptor D4**

El gen que codifica para la proteína del receptor D4 (DRD4) se encuentra en el cromosoma humano número 11. Este receptor tiene varios polimorfismos, específicamente en la región que codifica para la tercera asa intracelular, que consiste en un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) en la cual una secuencia de 48 pares de bases se repite de 2 a 11 veces, generando 11 isoformas de esta proteína (Oak 2000). La isoforma más abundante y por lo tanto más estudiada en el cerebro humano es la D 4.4 con un 60% de expresión con respecto a las demás isoformas, mientras que la D 4.2 y D 4.7 se presentan en un 14% y 10% de la población respectivamente (Cohen 1999). El receptor D4 se expresa claramente en el Sistema Nervioso Central, se ha encontrado en el Núcleo Estriado, Globo pálido, Corteza prefrontal, Amígdala, Hipocampo, Tubérculo olfatorio, Núcleo supraóptico y Cerebelo; este receptor también ha sido localizado en la retina.

La activación de los receptores D4 genera de inicio la inhibición de la adenilato ciclasa a través de proteínas G $\alpha$  i/o, la modulación de la entrada de calcio a la neurona, la activación de canales rectificadores de entrada de potasio, y la liberación de ácido araquidónico (Graziane 2009). La activación de estos receptores también incluye la activación de las vías ERK 1 / 2 y la disminución de la función de receptores GABA A (Yuen 2000). En el lapso de estudio del receptor D4 desde su descubrimiento se ha caracterizado un agonista selectivo potente: PD-168,077 que se ha utilizado en estudios in vivo e in vitro, también se sintetizó y caracterizó un antagonista altamente selectivo L-745870. A pesar de las muchas isoformas que presenta este receptor, el perfil farmacológico de cada una de ellas no es significativamente diferente.

La localización de este receptor en los Ganglios Basales ha dado pie a especular acerca de su función sobre la regulación de la actividad motora en los individuos. Se ha demostrado que los receptores D4 localizados en las terminales cortico-estriatales modulan la liberación de glutamato (González 2012).

En el Globo pálido estudios electrofisiológicos mostraron que el receptor D4 se encuentra localizado de manera post-sináptica, ya que la activación de los mismos produce una disminución de la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias sin modificar la frecuencia (Hernández 2006). Estudios experimentales también mostraron que al activar este receptor en el Núcleo reticular del Tálamo con dopamina disminuye la actividad locomotora en la rata, y por último se tiene evidencia de la presencia del receptor D4 en la Sustancia Nigra Reticulada, estos provenientes de las terminales palidales y que además se encuentran modulando la liberación de GABA de esta terminal a nivel de los somas de la SNr (Acosta 2010, Flores 1990, Rivera 2003).

▪ ***Receptor D4 en denervación dopaminérgica***

Estudios específicos del receptor D4 durante la denervación dopaminérgica en un modelo de Parkinson experimental en rata, mostraron que el receptor se encuentra aumentado en cuanto a expresión mediante la técnica de Western blot. Por otro lado también se mostró en experimentos de liberación de [<sup>3</sup>H] GABA que el receptor D4 se encuentra modulando la inhibición de la liberación de este neurotransmisor proveniente del Globo pálido, además se comprobó por binding que el receptor se encuentra sensibilizado ya que su Kd se encuentra disminuida lo que indica mayor afinidad por su ligando durante la denervación dopaminérgica (Acosta 2010, Florán 2011) (Fig. 5 A y B). Los datos anteriores pueden sugerir un aspecto fisiopatológico de la enfermedad de Parkinson que no ha sido considerado en la clínica. La localización del receptor D4 le confiere una función importante, también es de relevancia que proviene de terminales GABAérgicas; la neurotransmisión GABAérgica relevante en los núcleos de salida para la generación de movimiento, por lo anterior el manejo farmacológico de dicho receptor puede ser de relevancia clínica.

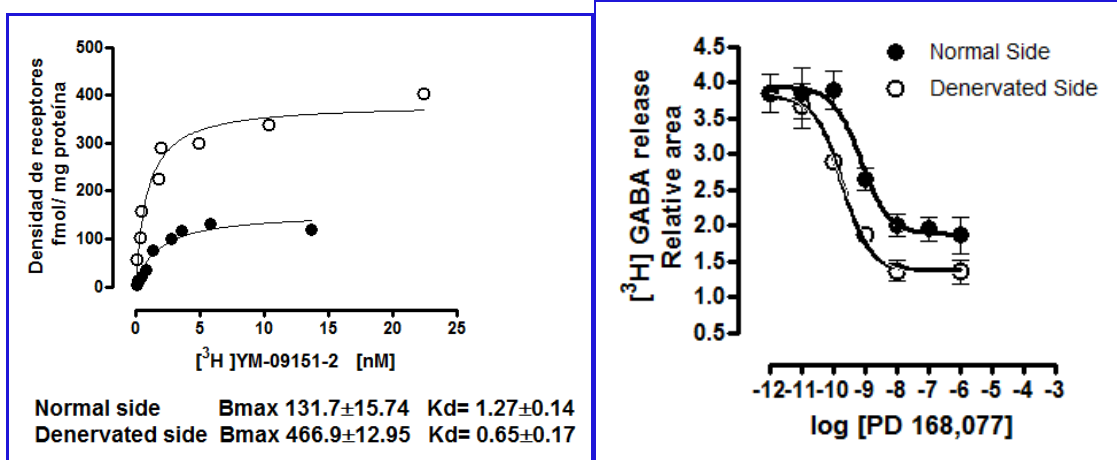


Figura 5. A. Curva de “Binding” del receptor D4 en la SNr de rata durante la denervación dopaminérgica. B. Curva dosis respuesta de la liberación de [<sup>3</sup>H] GABA en la Sustancia Nigra Reticulada de rata modulada por el receptor D4 usando su agonista selectivo PD-168077.

### 1.3 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson EP es un trastorno que se caracteriza por la pérdida gradual de la capacidad de los pacientes para ejecutar un movimiento. Clínicamente se identifica por la aparición de síntomas como: temblor en reposo de las extremidades superiores principalmente, inestabilidad de la postura, rigidez muscular y lentitud anormal del movimiento ó bradicinesia, de una manera menos frecuente aparecen también alteraciones en el equilibrio y depresión, y finalmente en etapas tardías aparecen alteraciones autonómicas y demencia. La EP afecta aproximadamente al 2% de las personas mayores de 65 años en el mundo y ocupa el segundo lugar de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes, en México se calcula que 50 de cada 100,000 habitantes pueden padecerla.

- **Fisiopatología**

La característica patológica principal de esta enfermedad es la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, esta pérdida de la inervación dopaminérgica en los núcleos de los Ganglios Basales produce una serie de cambios funcionales que afectan el circuito motor y que son críticos para el control del movimiento.

Los mecanismos ó causa exacta del porque de la enfermedad son desconocidos, sin embargo se ha propuesto varias teoría que podrían explicarla.

- Existencia de genes mutados, que han sido identificados en casos de Parkinson heredado.
- La combinación de procesos que incluye: deficiencia de factores de crecimiento, disfunción en sistemas de degradación de proteínas y mecanismos excitotóxicos celulares.
- Exposición a tóxicos: Pesticidas.
- Envejecimiento celular acelerado y estrés oxidativo.

Algunas de las características en cuanto a la patología de la EP se han podido reproducir en modelos animales como la lesión en roedor con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y primates tratados con la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Son aspectos bioquímicos, electrofisiológicos e incluso conductuales fielmente reproducidos en los mencionados modelos lo que ha permitido diseñar estrategias quirúrgicas, farmacológicas y clínicas para mejorar la calidad de vida de los pacientes con EP.

- **Terapia**

- **-L-dopa (Levodopa/carbidopa)**

Es el tratamiento más utilizado y más eficaz para la enfermedad de Parkinson, su efecto terapéutico se deben a su conversión a dopamina a nivel del cerebro (Ver Fig. 6). La L-dopa se administra en conjunto con un inhibidor de la descarboxilasa periférica Bencerazida, que le permite atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar altas concentraciones en cerebro. Una vez en el cerebro, la L-dopa debe ser convertida a dopamina y ejercer su efecto activando los receptores para el neurotransmisor. Esto constituye la base de lo se conoce como "mecanismo de acción por reemplazo". Se han desarrollado diversas teorías acerca de cómo la L-dopa logra restaurar el circuito encargado de la función motora en los pacientes tratados (Florán 2005).

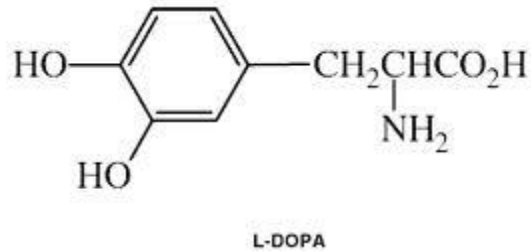


Figura 6. Estructura química de la L-dopa.

En cuanto a inconvenientes, el tratamiento con L-dopa presenta a un plazo de 5 años en promedio el efecto secundario denominado discinesia, que son movimientos involuntarios anormales en los pacientes y que pueden llegar a ser discapacitantes para los mismos. Este fenómeno derivado del tratamiento será el objeto de estudio para esta investigación como se esclarece más adelante.

#### ***-Otros tratamientos farmacológicos***

Agonistas dopaminérgicos: Bromocriptina, apomorfina, pramiprexol, ropirinol, carbegolina y lisuride. Con efectos secundarios de leves a moderados y algunos utilizados en conjunto con L-dopa.

Inhibidores de la COMT: Preservan la dopamina existente evitando su degradación. Tienen como efecto adverso fluctuaciones motoras y alteraciones gástricas.

Inhibidor de la MAO-B: Inhiben la enzima encargada de la degradación de dopamina, se utiliza en etapas tempranas de la enfermedad.

Anticolinérgicos: Debido a que el déficit de dopamina lleva a la sobreactivación de vías colinérgicas, este fármaco permite un equilibrio entre dopamina y acetilcolina en el estriado.

Amantadina: Bloquea la recaptura de dopamina aumentando su liberación.

#### ***-Procesos quirúrgicos***

Palidotomía: Destrucción del globo pálido por medio de un electrodo.

Trasplantes: Se trasplantan células productoras de dopamina, la técnica está en fase experimental y los resultados son desconocidos.

Estimulación cerebral profunda: consiste en el implante de un electrodo que funciona con el mismo principio de un marcapasos cardíaco.

#### **1.4 Patogénesis de las discinesias inducidas por L-dopa**

Aunque la L-dopa puede considerarse el tratamiento de elección para pacientes con enfermedad de Parkinson, su efecto secundario, las discinesias, representan un obstáculo para el mantenimiento de una vida de calidad para el paciente (Bezard 2001). Las discinesias se caracterizan por ser movimientos involuntarios anormales que se presentan en la cara, cuello, extremidades y la parte axial del cuerpo, generalmente aparecen a los 5 años de iniciado el tratamiento con L-dopa, aunque en algunos pacientes pueden aparecer de manera temprana.

A lo largo de muchos años de investigación se ha realizado un consenso a cerca de la génesis de las discinesias, que converge en una posible sobreactividad de la vía directa en el circuito de los ganglios basales, que se explica por un incremento en la transmisión GABAérgica del Estriado al complejo de salida del circuito de una forma exacerbada lo que generaría movimiento anormales e involuntarios en el individuo (Mela 2007).

Existen otras hipótesis de la generación de discinesias que explican cambios a nivel molecular y celular en los Ganglios Basales, inducidos por el tratamiento crónico con L-dopa a nivel de modelos experimentales. Entre los cambios moleculares y celulares en estas condiciones es posible mencionar lo siguiente:

- ✓ Incremento en la expresión de genes tempranos como C-fos y C-jun lo que sugiere una actividad incrementada de las neuronas estriatales (Gerfen 2002), también este tratamiento en modelos de roedores produce un incremento en la producción de sustancia P y dinorfina consistente con lo anterior.
- ✓ Se ha comprobado un incremento en la fosforilación de ERK 1 / 2 durante la denervación dopaminérgica y el tratamiento con L-dopa, esto puede indicar una activación anómala de la vía de las MAPKs mediada por la activación crónica del receptor D1 (Gerfen 2003).



- ✓ Incremento en la vía de señalización del receptor D1 localizado en la vía directa de los Ganglios Basales. Se ha comprobado en estudios previos que hay un incremento en la acumulación de [<sup>3</sup>H]AMPC y de [<sup>3</sup>H]GABA en la Sustancia Nigra Reticulada de ratas discinéticas con respecto a las clasificadas como no discinéticas mediada por la activación del receptor D1 (Rangel 2011, Cenci 1998).
- ✓ Incremento en la expresión de la enzima encargada de la síntesis de GABA. Se demostró la expresión incrementada de la descarboxilasa de GABA (GAD), primeramente en animales denervados, de igual forma se comprobó que la expresión de esta enzima incluso en sus dos isoformas se incrementaba aun más durante el tratamiento con L-dopa (Katz 2005), por lo que una mayor disponibilidad de GABA podría ser responsable de un incremento en su propia liberación.

Es por tanto, tomar en cuenta que de forma particular la vía directa del circuito de los Ganglios Basales esta críticamente envuelta en la génesis de las discinesias, que si bien la denervación dopaminérgica genera cambios plásticos neuronales y moleculares, el tratamiento con L-dopa no los restaura a su condición original.

Los modelos experimentales de Parkinson han permitido a la comunidad científica interesada reproducir los efectos del tratamiento con L-dopa de tal forma que se presente este efecto secundario y con ello se han podido especular las posibles causas del mismo. El factor determinante para que un individuo realice un movimiento se encuentra puntualizado en el hecho de que los núcleos de salida se encuentren inhibidos por una cantidad dada de GABA liberado en los mismos; tomando en cuenta que el complejo SNr/GPi cuentan con dos fuentes de GABA importantes estriado-nigral y pálido-nigral, es posible plantear una estrategia farmacológica tal que GABA sea suficiente en los núcleos de salida para producir movimiento en el individuo (efecto terapéutico), pero no excesivamente como para producir discinesias (efecto adverso) en el caso de un tratamiento con L-dopa.

Por lo anterior es posible proponer que dosis subterapéuticas de L-dopa estimularan menor magnitud a los receptores D1 de vía directa (responsable principal de las discinesias) y que la coadministración del antagonista L-745,870 podría producir la salida de GABA de la terminal palidal hacia la SNr de tal forma que la inhibición de los núcleos de salida facilitaran el movimiento en el individuo, aplazando la aparición de discinesias por las dosis bajas de L-dopa usadas.

## **2. Justificación**

La enfermedad de Parkinson continúa siendo un problema de salud y las medidas terapéuticas actuales no han sido suficientes para mejorar por más tiempo la calidad de vida de los pacientes. Es por esto que se requieren nuevos esquemas terapéuticos basados en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad para el manejo de estos pacientes. La L-dopa continúa siendo la opción más usada ya que restaura el movimiento de los pacientes, pero debido a los efectos colaterales que presenta se discontinúa limitando su uso prolongado. Desde nuestra perspectiva, eliminar o prevenir el desarrollo de la sintomatología adversa puede ser útil para prolongar el uso de la L-dopa y por lo tanto la calidad de vida de los pacientes.

Debido a que los receptores D4 localizados en las terminales pálido-nigrales se encuentran participando en la modulación de la liberación de GABA, es importante evaluar su papel durante el tratamiento del Parkinson experimental con L-DOPA ya que puede ser un blanco terapéutico dirigido a reducir las discinesias causadas por L-DOPA sin modificar el efecto terapéutico.

En este trabajo se proponen diversos ensayos terapéuticos basados en el uso de L-dopa y el antagonista de receptores D4, el L 745870 que ayudaran a entender el papel de estos receptores en el Parkinson y su posible uso clínico.

## **3. Hipótesis**

El bloqueo del receptor D4 como coadyuvante en el tratamiento con dosis subterapéuticas de L-DOPA mantiene un efecto terapéutico adecuado.

## **4. Objetivos**

Estudiar la participación del receptor D4 en el tratamiento del Parkinson experimental con L-DOPA y su bloqueo farmacológico como posible uso terapéutico.

### **4.1 Objetivos particulares**

- 1.- Determinar si en el tratamiento con L-DOPA en el Parkinson experimental se activan los receptores dopaminérgicos D4.
- 2.- Evaluar el efecto de la administración del antagonista de los receptores D4 conjuntamente con dosis terapéuticas y subterapéuticas de L-DOPA sobre la recuperación motora funcional.
- 3.- Evaluar el efecto de la administración del antagonista de los receptores D4 conjuntamente con dosis terapéuticas y subterapéuticas de L-DOPA sobre las discinesias inducidas.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1 Animales**

Para los estudios realizados se utilizó rata macho de la cepa Wistar con pesos de 200-240 g. Los animales fueron manejados en condiciones de habituación de bioterio: temperatura del ambiente de 18-23 °C, en ciclo de luz-obscuridad de 12 horas y alimentación ad libitum.

### **5.2 Lesión con 6-hidroxidopamina**

Se utilizó un modelo de Parkinson experimental inducido mediante la inyección de 1 µl de 6-hidroxidopamina (6-OHDA 16 µg/µl disuelta en solución salina 0.9% y ácido ascórbico 0.1%), esta neurotoxina provoca la muerte de las neuronas dopaminérgicas inyectada en el haz del cerebro medio. Los animales fueron anestesiados con Ketamina (112.5 mg/Kg) y Xilacina (22.5 mg/Kg) intraperitoneal, con la ayuda de un aparato estereotáxico se realizó una cirugía donde se localizaron las coordenadas del haz del cerebro medio reportadas en el atlas anatómico Paxinos y Watson de 1986.

La microinyección se llevó a cabo de manera unilateral y de una forma paulatina: 1 µl de toxina en 10 minutos de inyección, las coordenadas son -1.8 mm anteroposterior, 2.4 mm lateral y 7 mm dorso-ventral. Todos los animales fueron pre-tratados con imipramina (10 mg/Kg) 40 minutos antes de inyectar la toxina para proteger las neuronas noradrenérgicas.

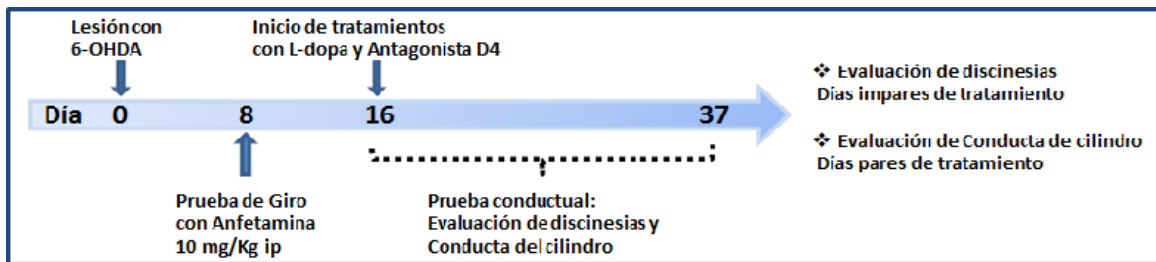


Figura 7. Cronograma de experimentos a partir del día de lesión.

### 5.3 Conducta de giro

El diseño experimental y cronograma de experimentos se esquematiza en la figura 7. Después de 8 días de realizada la cirugía, se llevó a cabo la prueba conductual de giro para corroborar el grado de lesión, la conducta de giro fue inducida por una inyección intraperitoneal (10 mg/Kg). Todos aquellos animales que presentaron 8 giros por minuto durante una hora fueron agregados para los estudios conductuales.

### 5.4 Tratamiento con L-dopa y L-745870

Pasados 8 días después de la prueba de giro, se llevaron a cabo los tratamientos mostrados en la figura 8. En el caso de la administración de dosis de 5 y 10 mg/Kg de L-dopa, esta se administró en conjunto con bencerasida 15 mg/Kg para inhibir a la descarboxilasa periférica de aminoácidos aromáticos y así evitar el metabolismo de la L-dopa antes de atravesar la barrera hematoencefálica.

Los tratamiento que incluyen al antagonista selectivo L-745,870, se realizaron inyectando el antagonista y posteriormente la L-dopa en las dosis indicadas, esto con el fin de bloquear al receptor antes de que pudiera ser activado por la L-dopa.

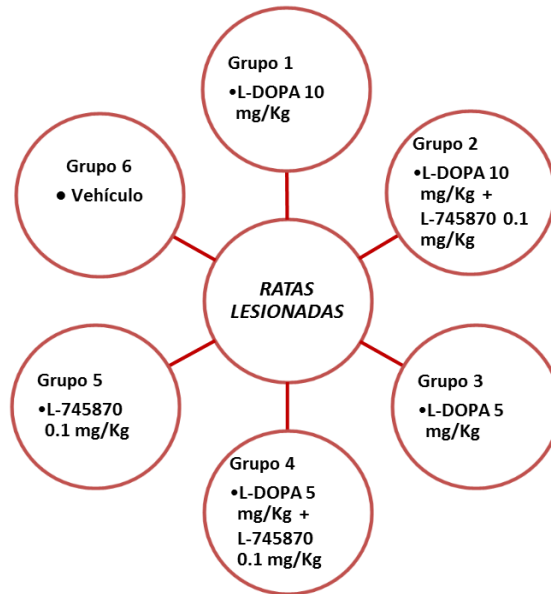
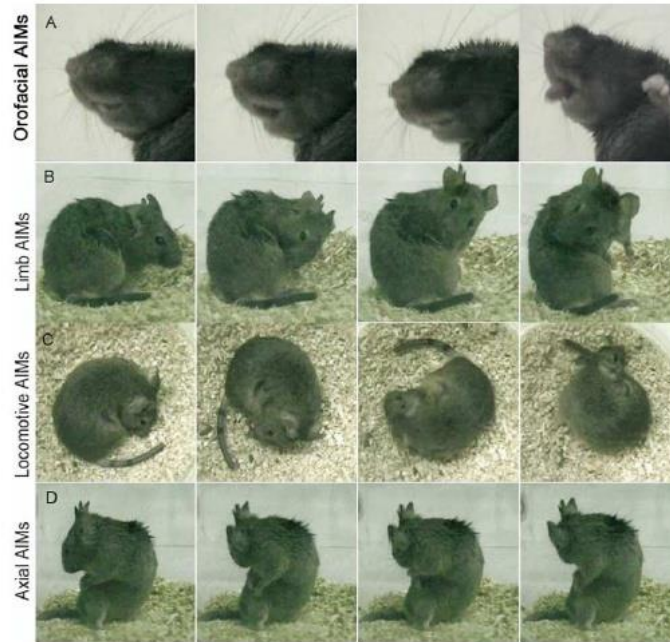


Figura 8. Grupos de tratamiento a partir de la correcta denervación dopaminérgica.

### 5.5 Evaluación conductual de discinesias

Se utilizó una escala de discinesias (AIMs) descrita de forma previa por Cenci y colaboradores en 1998. Las discinesias se evalúan de una manera topográfica en los siguientes tipos: discinesia locomotora (incremento de actividad motora del lado contrario a la lesión cuantificada en giros), discinesia axial (torsión de cuello), discinesia orolingual (registrado como movimientos estereotipados de masticación al vacío y protrusión de la lengua) y discinesia de extremidades (postura distónica de las extremidades inferiores y torsión de la pata trasera contralateral a la lesión), los tipos de discinesias se observan en la figura 9.



**Figura 9. Discinesias presentadas tras el tratamiento con L-dopa en un modelo de lesión dopaminérgica unilateral.**

Las discinesias se registraron los días impares de tratamiento. Pasados 20 minutos de la inyección con L-dopa o en su defecto la coadministración con L-745,870 y L-dopa en las dosis mencionadas, los animales fueron observados en períodos de 3 minutos cada 20 minutos durante un tiempo total de 3 horas. Los puntajes asignados fueron: (0) si no se presenta la discinesia, (1) si se presenta de manera ocasional menos de la mitad del tiempo de observación, (2) se presenta la mitad del tiempo, (3) se presenta más de la mitad del tiempo de observación y suprime con estímulos sensoriales y (4) se presenta todo el tiempo y no suprime con estímulos sensoriales.

De acuerdo a datos presentados por Rangel en 2011, el tratamiento con L-dopa en animales lesionados unilateralmente lleva a la generación de dos grupos poblacionales que presentan distinta severidad de las discinesias. Se estableció el grupo de No discinesias con puntajes de 0 a 31 y el grupo de Discinesias severas de 32 a 108 puntos. En cada grupo tratado se realizó la clasificación de los animales en último día de tratamiento y de esta forma se agruparon los datos obtenidos.

## **5.6 Prueba del cilindro**

La prueba de conducta del cilindro se realizó los días pares de tratamiento, 30 minutos después de la inyección del o los fármacos, los animales fueron colocados en un cilindro de acrílico transparente de 20 cm de diámetro por 30 cm de alto. Desde una perspectiva superior del cilindro lo cual permitió observar claramente la extensión de las extremidades delanteras, se registraron 30 minutos de grabación que posteriormente fueron analizadas.

El análisis de los videos consistió en cuantificar los toques sobre las paredes del cilindro por parte de cada animal, separando los toques de la extremidad contralateral a la lesión y los toques de la extremidad ipsilateral a la lesión, de tal forma que se calculó el índice de asimetría con dichos datos de la siguiente manera.

$$\text{ÍNDICE DE ASIMETRÍA} = \frac{\text{TOQUES DE LA EXTREMIDAD CONTRALATERAL} \times 100}{\text{TOQUES DE LA EXTREMIDAD IPSILATERAL}}$$

Durante el tratamiento se evaluó en diez ocasiones este índice, el valor del índice indica el porcentaje de uso de la extremidad que rige el lado lesionado con respecto al lado sano y además permitió observar posibles cambios con respecto a cada grupo tratado.

## **5.8 Soluciones Utilizadas**

Krebs normal: NaCl (124.5 mM), KCl (3 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2 mM), CaCl<sub>2</sub> (1.8mM), NaHCO<sub>3</sub> (16.5 mM), Glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Krebs alto potasio: NaCl (112.5 mM), KCl (15 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2 mM), CaCl<sub>2</sub> (1.8 mM), NaHCO<sub>3</sub> (16.5 mM), Glucosa (11 mM) a un pH de 7.4.

Solución salina: NaCl 0.9%.

Solución de ácido ascórbico: NaCl 0.9% y Ácido ascórbico 0.1%.



## **5.9 Análisis estadístico**

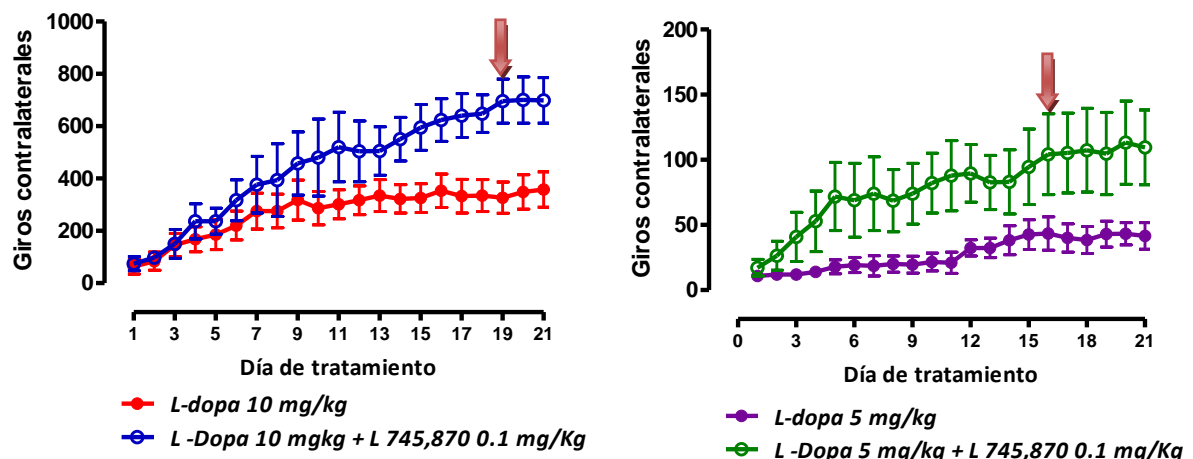
Los datos obtenidos de la conducta de giro , las discinesias y el índice terapéutico al final del tratamiento fueron analizados mediante el software Graph Pad Prims, usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey, para comparar los promedios de los diferentes puntajes obtenidos para los grupos tratados. En los estudios del curso temporal de la conducta de giro la diferencia entre los grupos se analizó mediante la prueba de ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni para determinar el día a partir del cual los grupos presentaban diferencias estadísticas en la respuesta.

En el caso de los datos obtenidos en el índice de asimetría a los largo de los diferentes días de tratamiento y el último día de tratamiento, se obtuvo el promedio de cada grupo tratado discinético o no discinético, y se compararon con el valor teórico esperado que es de 100 mediante una t-simple, a lo largo de los diferentes días de tratamiento para determinar el momento en que se alcanzaba el efecto terapéutico deseado. La incidencia de animales discinéticos vs. No discinéticos en los diferentes grupos se analizó mediante la prueba exacta de Fisher.

## 6. Resultados

### 6.1 Activación del receptor D4 durante el tratamiento con L-dopa

Para comprobar si los receptores a dopamina D4 se están activando durante el tratamiento con L-dopa, se realizaron cuatro grupos experimentales de tratamiento: L-dopa 10 mg/Kg, L-dopa 10 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg, L-dopa 5 mg/Kg y L-dopa 5 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg. La discinesia locomotora o marcha asimétrica se caracteriza por la aparición de giro contralateral a la lesión en el animal que refleja la sensibilización provocada por la denervación dopaminérgica y que además es agravada por el tratamiento con L-dopa (priming). El efecto del bloqueo de los receptores D4 en la conducta de giro inducida por L-dopa se muestra en la gráfica 1. El bloqueo del receptor D4 con su agonista L 745,870, potenció la conducta de giro inducida por el tratamiento con L-dopa a dos diferentes dosis. En el grupo que recibió 10 mg/kg este efecto fue evidente desde el día 9 y estadísticamente diferente desde el día 19; al día 21 de tratamiento los giros totales en grupo L-dopa 10 mg/kg fueron de  $357 \pm 67$  vs.  $698 \pm 86$  del grupo L-dopa 10 mg/Kg + L 745,870, ( $p \leq 0.05$   $n = 7$ , ANOVA de dos vías).



Gráfica 1. Curso temporal de la conducta de giro inducida por L-dopa 10 mg/kg i.p. (A) y 5 mg/kg i.p. (B) en ausencia y presencia del antagonista selectivo de los receptores D4 L745,870 0.1 mg/kg i.p. Se grafica el número total de giros en una sesión de 3 horas durante los días impares de 21 días de tratamiento a cuatro grupos de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OH dopamina en el haz del cerebro medio 15 días antes del inicio del tratamiento. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  con respecto del grupo que solo recibió L-dopa. La barra indica el período en el que se encontró la diferencia estadística.  $n = 7$  y  $5$  en cada grupo en A y en B respectivamente. ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni. La flecha indica el día a partir de que el análisis fue estadísticamente significativo.

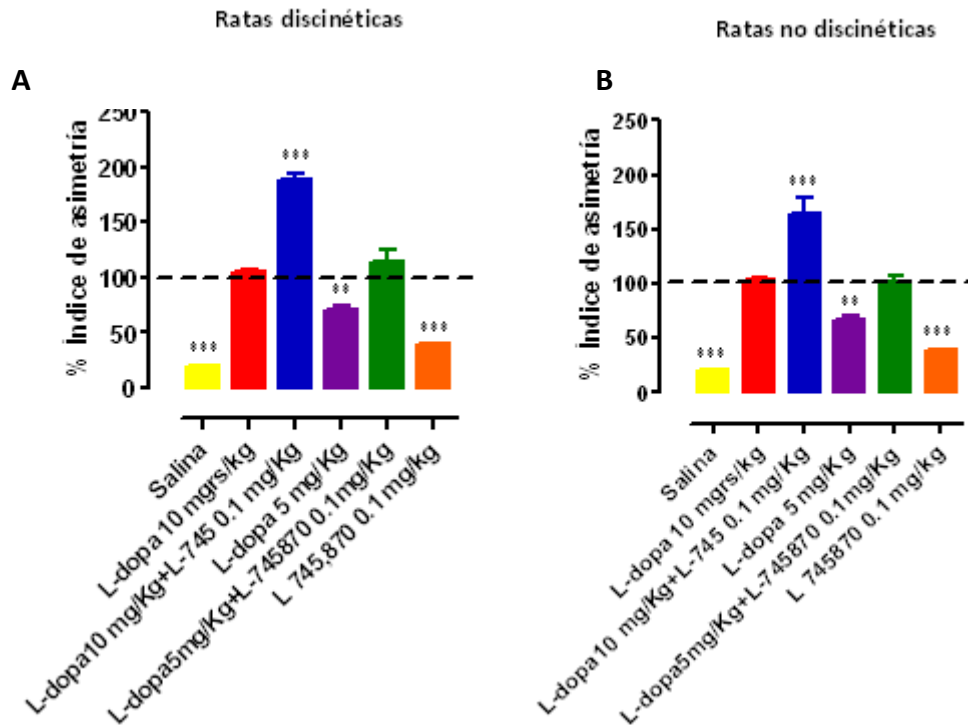
Lo mismo ocurrió en el grupo 5 mg/kg en donde el efecto fue estadísticamente diferente desde el día 16 y al 21 día de tratamiento los giros totales en grupo L-dopa 5 mg/kg fueron de  $10 \pm 5$  vs  $109 \pm 28$  del grupo L-dopa + L 745,870, ( $n= 5$ ,  $p < 0.05$  ANOVA de dos vías).

## **6.2 Efecto del tratamiento crónico con dosis subterapéuticas de L-dopa y el antagonista del receptor D4 L-745,870 sobre el índice de asimetría**

El índice de asimetría fue evaluado para cada grupo los días pares del tratamiento con la idea de observar si el tratamiento con la dosis subterapéutica de L-dopa y el antagonista del receptor D4 podría producir una recuperación de la actividad motora del lado contralateral al lado denervado al igual que una dosis terapéutica de L-dopa ya conocida. Los resultados de los diferentes tratamiento al día 20, basados en la prueba del cilindro se muestran en la gráfica 2. Cabe mencionar que los animales fueron divididos a su vez en los que desarrollaron o no discinesias de acuerdo a los criterios de Rangel en 2011, con el objeto de ver si el efecto del bloqueo del receptor sobre el índice terapéutico también dependía de si se desarrollaban o no discinesias.

Al calcular el índice de asimetría y obtener el promedio para cada grupo se obtuvo lo siguiente: el grupo tratado con solución salina (barra amarilla) utilizó aproximadamente  $25 \pm 5\%$  la extremidad contralateral a la lesión, este valor se comparó contra el valor hipotético de 100 (que representa el uso indistinto de las extremidades) en una prueba de t de Student simple en la que resultó ser diferente con un valor de  $p \leq 0.0001$ . El tratamiento de L-dopa 10 mg/Kg (barra roja) produjo un índice en promedio de  $106 \pm 4\%$ , dicha cifra no es significativamente diferente del valor de referencia. El tratamiento conjunto de L-dopa 10 mg/Kg y L-745870 0.1 mg/Kg (barra azul) originó un índice de asimetría en el último día evaluado de  $180 \pm 9\%$ , indicando mayor uso de la pata ipsilateral a la lesión, valor diferente a la referencia establecida  $p \leq 0.0001$ . El grupo administrado con L-dopa 5 mg/Kg alcanzó únicamente un índice de  $70 \pm 5\%$  aproximadamente, valor estadísticamente diferente a 100  $p \leq 0.007$ .

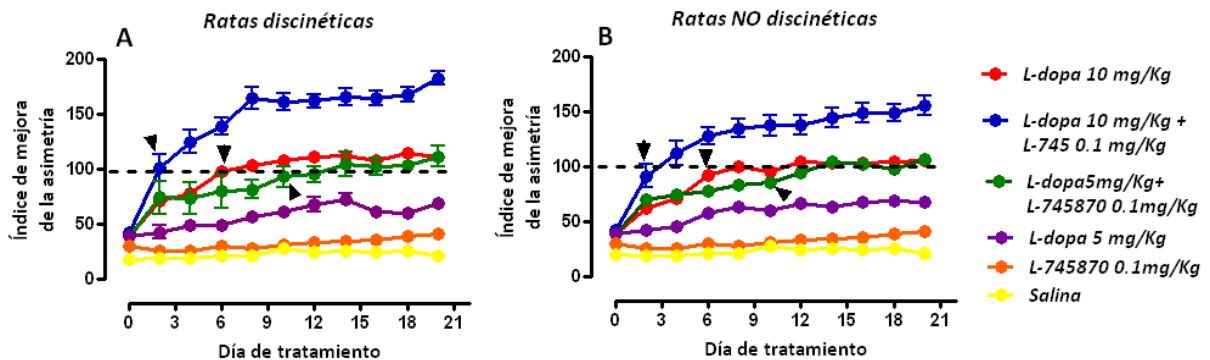
De manera importante el grupo de animales tratados con L-dopa 5 mg/Kg y L-745870 0.1 mg/Kg logró provocar un índice de  $110 \pm 5\%$  (sin diferencia significativa con respecto a 100) y por último el grupo tratado únicamente con L-745870 0.1 mg/Kg alcanzó el valor de  $46 \pm 4\%$  de índice de asimetría  $p \leq 0.0001$ .



Gráfica 2. Índice de asimetría del último día de evaluación de 6 diferentes grupos de tratamiento. A. Ratas discinéticas. B. Ratas no discinéticas. Se grafica el promedio del índice de asimetría calculado en una sesión de 30 minutos de grabación por rata de cada grupo tratado 30 minutos después de inyectados los fármacos. \*\*p≤0.007, \*\*\*p≤0.0001 con respecto a un valor hipotético de 100. T de student simple.

Los índices para las ratas no discinéticas fueron los siguientes para cada grupo: Salina  $23 \pm 5\%$ , L-dopa 10 mg/Kg  $98 \pm 7\%$ , L-dopa 10 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg  $172 \pm 8\%$ , L-dopa 5 mg/Kg  $75 \pm 9\%$ , L-dopa 5 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg  $101 \pm 6\%$  y L-745870 0.1 mg/Kg  $46 \pm 6\%$ . El efecto de cada tratamiento en el último día de evaluación fue claramente similar en el grupo de animales clasificados como discinéticos y no discinéticos. Debido a que los lapsos de discinesias en los animales son por períodos de tiempo cortos, fue posible observar fases de exploración en los cilindros y por lo tanto obtener datos para calcular el índice de asimetría.

El curso temporal de la mejora del índice de asimetría es observado en la gráfica 3. El grupo de L-dopa 10 mg/Kg alcanzó un índice óptimo de aproximadamente 100% entre el quinto y sexto día de tratamiento (esto comprobado por una prueba de T de student simple con respecto a 100); mientras que el tratamiento de L-dopa 10 mg/Kg y L-745870 0.1 mg/Kg logró alcanzar un valor no diferente significativamente de 100 al segundo día de evaluación, cabe señalar que fue la única sesión donde alcanzó este valor.

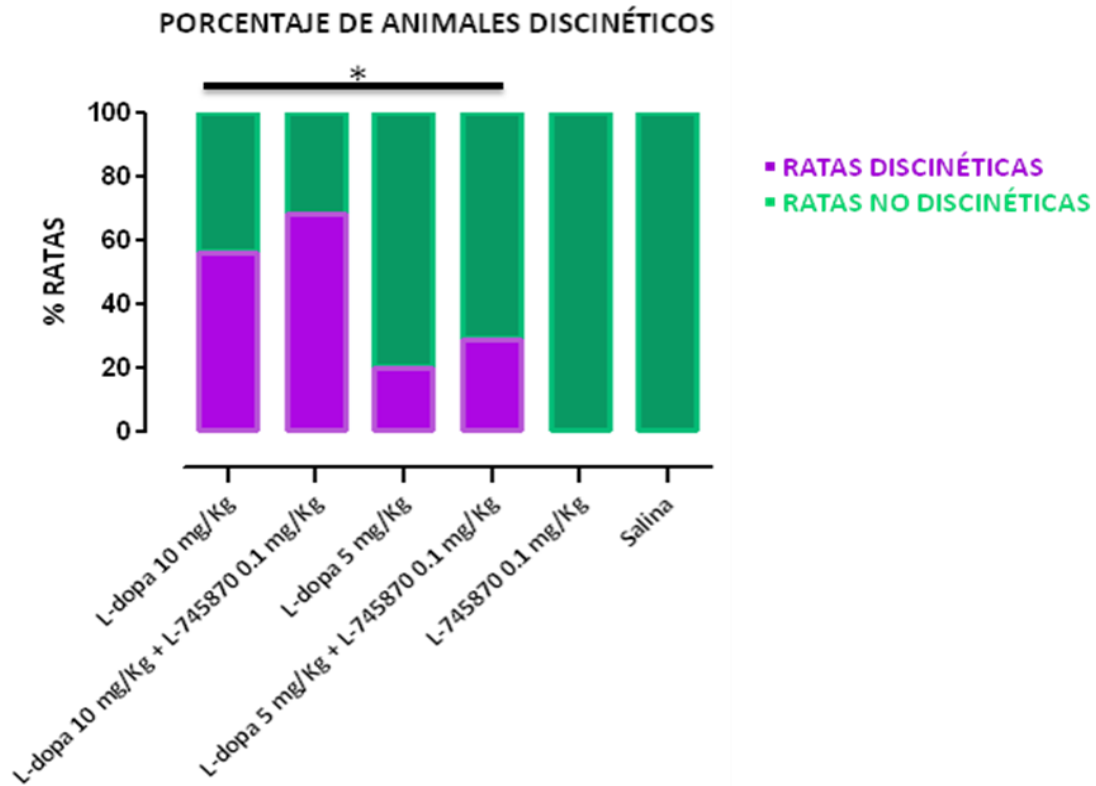


Gráfica 3. Curso temporal del índice de asimetría. (A) Ratas discinéticas. (B) Ratas no discinéticas. Se grafica el promedio del índice de asimetría evaluado los días pares de tratamiento en una sesión de 30 minutos de grabación por rata de cada grupo tratado 30 minutos después de inyectados los fármacos. Las flechas muestran el día en que los tratamientos alcanzaron un valor sin diferencia significativa sobre el 100% ideal para el índice de asimetría.

El grupo de animales tratados con L-dopa 5 mg/Kg a pesar de desarrollar un aumento del índice de asimetría a lo largo de los días este solo llegó a concretarse en 70% y por su parte el grupo administrado solo con el antagonista de los receptores D4 alcanzó durante todo el tratamiento valores menores y significativamente diferentes al valor establecido en el análisis estadístico. El grupo salina por su parte se mantuvo en valores cercanos a 25% durante todo el protocolo de tratamiento. El día en que cada grupo alcanzo una cifra no diferente de 100, fue el mismo en caso de los animales discinéticos y no discinéticos.

### 6.3 Efecto del tratamiento crónico con dosis subterapéuticas de L-dopa y el antagonista del receptor D4 L-745,870 sobre la incidencia de discinesias

Para evaluar la incidencia de aparición de discinesias graves, al separar los animales mediante las puntuaciones de discinesias establecidas en el trabajo de Rangel 2009 encontramos que: El grupo tratado con 10 mg/Kg de L-dopa (dosis conocida como terapéutica) presentó un 56% de población discinética; por su parte el grupo L-dopa 10 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg obtuvo un 68% que según la prueba de Fisher no tiene diferencia significativa con el grupo anterior (Ver gráfica 4).



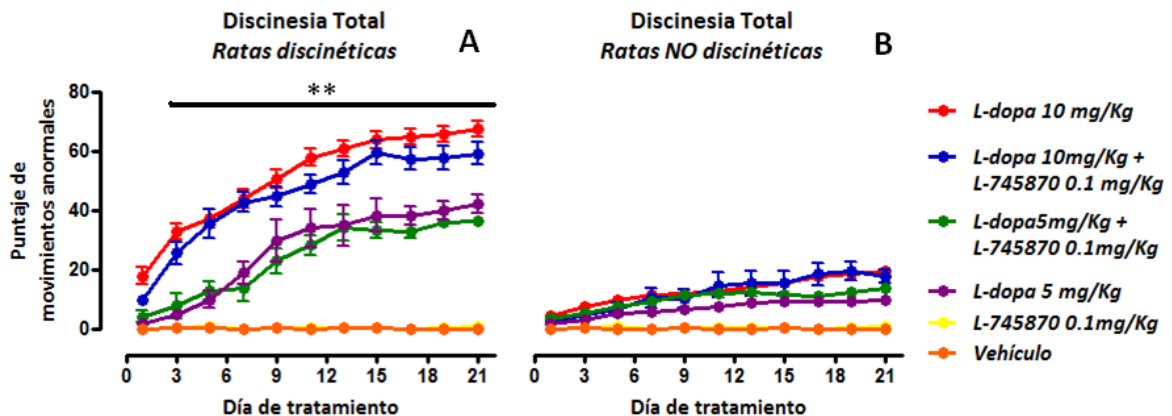
Gráfica 4. Porcentaje de animales discinéticos y no discinéticos en cada grupo. Se grafica en color morado el porcentaje de animales discinéticos y en verde el porcentaje de animales No discinéticos \*  $p \leq 0.05$ .

El grupo de L-dopa 5 mg/Kg mostró un 20% de animales con discinesias severas, mientras que la misma dosis de L-dopa en combinación con L-745870 0.1 mg/Kg produjo un 29% de animales discinéticos. Los porcentajes entre estos grupos no tuvieron diferencia estadísticamente significativa.

Por su parte los grupos administrados con L-745870 y solución salina no presentaron animales con discinesias, lo que indica que la administración de la L-dopa determina la aparición de discinesias. Un dato obtenido relevante en este análisis fue la comparación en el porcentaje de animales con discinesias entre los grupos L-dopa 10 mg/Kg (56%) y L-dopa 5 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg (29%) que por la prueba de Fisher se mostró que hay una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$  \*).

#### 6.4 Efecto del tratamiento crónico con dosis subterapéuticas de L-dopa y el antagonista del receptor D4 L-745,870 sobre el puntaje de discinesias

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de dosis subterapéuticas de L-dopa y el antagonista selectivo L-745,870 sobre las discinesias, se llevo a cabo el protocolo propuesto por Cenci en 1998. Los puntajes obtenidos para la discinesia axial, orolingual y de extremidades fue sumada y promediada en cada día de tratamiento. La clasificación en animales discinéticos y no discinéticos se realizó con el puntaje del último día del protocolo (Ver gráfica 5).



Gráfica 5. Curso temporal de las discinesias obtenidas por los grupos de animales tratados. A. Ratas discinéticas. B. Ratas no discinéticas. Se grafica el promedio del puntaje total de discinesias por sesión para cada subgrupo de ratas. El puntaje total se obtuvo de una evaluación de 3 horas a partir de la administración del fármaco. La barra muestra la significancia estadística entre los grupos tratados con L-dopa 5mg/Kg con y sin el antagonista D4 L-745,870 y los grupos tratados con L-dopa 10 mg/Kg con y sin el antagonista D4 L-745,870.  $p \leq 0.002$  \*\*. ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni.

Para la gráfica correspondiente a los animales discinéticos (Gráfica 5A): el desarrollo de discinesias fue claramente parecido entre los grupos de L-dopa 10 mg/Kg (puntaje máximo  $80 \pm 6$ ) y en coadministración con L-745870 0.1 mg/Kg (puntaje máximo  $81 \pm 7$ ). A través de los días los puntajes en ambos grupos fue ascendente y al realizar un análisis de varianza ANOVA de dos vías no hubo diferencia significativa en estos grupos. Los dos grupos tratados con 5 mg/Kg de L-dopa sin y con el antagonista del receptor D4 tuvieron una cinética del desarrollo de discinesias muy parecida entre ambos, los puntajes máximos obtenidos fueron los siguientes: L-dopa 5 mg/Kg  $39 \pm 5$  puntos y L-dopa 5 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg  $45 \pm 8$  puntos, estos datos no tuvieron diferencia estadísticamente significativa.

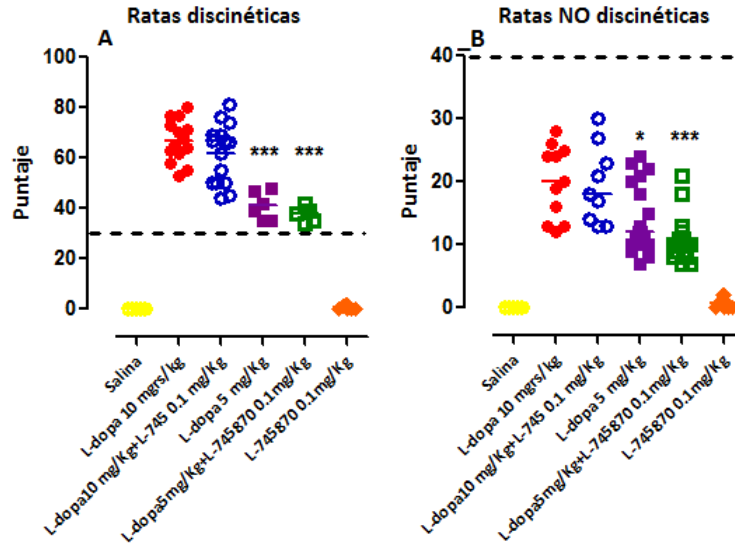
Los animales tratados solo con L-745870 y solución salina no presentaron discinesias per se. Por otra parte los subgrupos clasificados como no discinéticos tuvieron un desarrollo indistinto de las discinesias a lo largo del tratamiento, a excepción de los grupos L-745,870 y salina que no presentaron conducta discinética (Gráfica 5B).

Al comparar el promedio de puntajes para cada subgrupo por medio de una prueba de T de student se obtuvo diferencia significativa entre los grupos tratados con dosis de 5 mg/Kg de L-dopa y de 10 mg/Kg desde el tercer día de tratamiento hasta finalizarlo, así como también entre los grupos 5 mg/Kg de L-dopa + L-745,870 y de 10 mg/Kg + L-745,870, donde esta diferencia se observa también desde el tercer día.  $p \leq 0.0002$  \*\*\*.

Mediante un análisis de varianza ANOVA de dos vías fue posible comparar el promedio de puntaje de discinesias en el último día de tratamiento para cada subgrupo de animales tratados, obteniendo que los grupos de animales administrados con L-dopa 10 mg/Kg con y sin el antagonista de los receptores D4 tuvieron promedios de  $65 \pm 5$  y  $62 \pm 7$  respectivamente, mostrando además una dispersión de los datos parecida y sin diferencia estadística entre los promedios de ambos grupos.



En el caso de los grupos de 5 mg/Kg de L-dopa con y sin el antagonista de los receptores D4 mostraron promedios de 40±5 y 42±6 puntos de discinesia total y no alcanzaron diferencia estadísticamente significativa entre ellos, con la prueba antes mencionada. La dispersión de los datos entre los dos grupos fue similar.

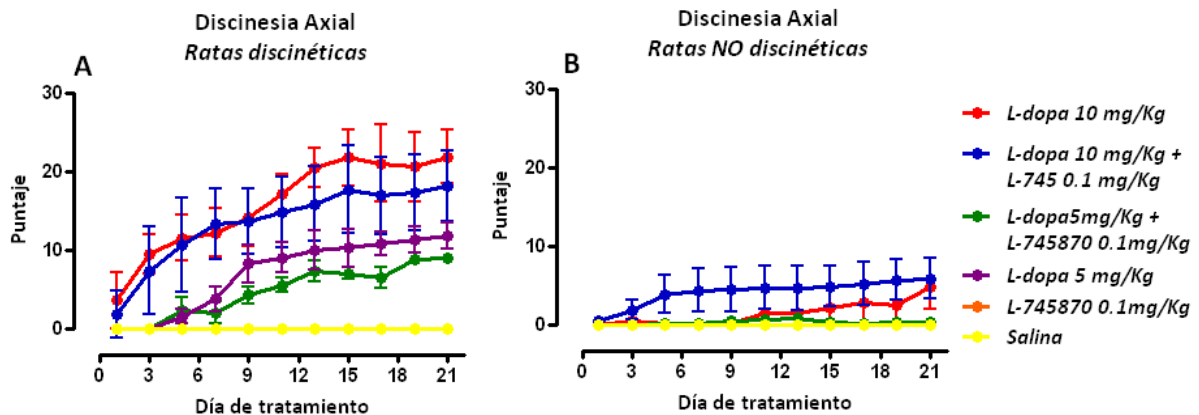


Gráfica 6. Puntaje de discinesias totales en el último día de tratamiento. Distribución de puntajes de ratas discinéticas (A) y no discinéticas (B). Se grafica el promedio del puntaje total de discinesias de la última sesión para cada subgrupo de ratas. El puntaje total se obtuvo de una evaluación de 3 horas a partir de la administración del fármaco.  $P \leq 0.0001^{***}$ ,  $P \leq 0.002^{**}$ . ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni.

#### 6.4.1 Discinesia axial

Con el objetivo de observar cambios en algún tipo de discinesias durante los tratamientos se graficaron los datos para cada una de ellas. El desarrollo de discinesia axial en los animales clasificados como discinéticos se presentó de la siguiente manera: El grupo de L-dopa 10 mg/Kg llegó a un puntaje promedio el último día de 22±8, mientras que para el grupo L-dopa 10 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg fue de 19±9, dato que no tiene diferencia significativa con el anterior. Los grupos de L-dopa 5 mg/Kg sin y con el antagonista D4 L-745870 tuvieron puntajes finales de 11±8 y 9±7 respectivamente de los cuales no hay diferencia con respecto a la estadística. Por su parte los grupos salina y L-745,870 no presentaron discinesias axiales (Gráfica 7).

Analizando los puntajes finales de los grupos con dosis de 10 mg/kg de L-dopa y los grupos de 5 mg/Kg de L-dopa mediante la prueba de varianza de una vía fue posible encontrar una diferencia significativa en todo el tratamiento  $p \leq 0.05$ .

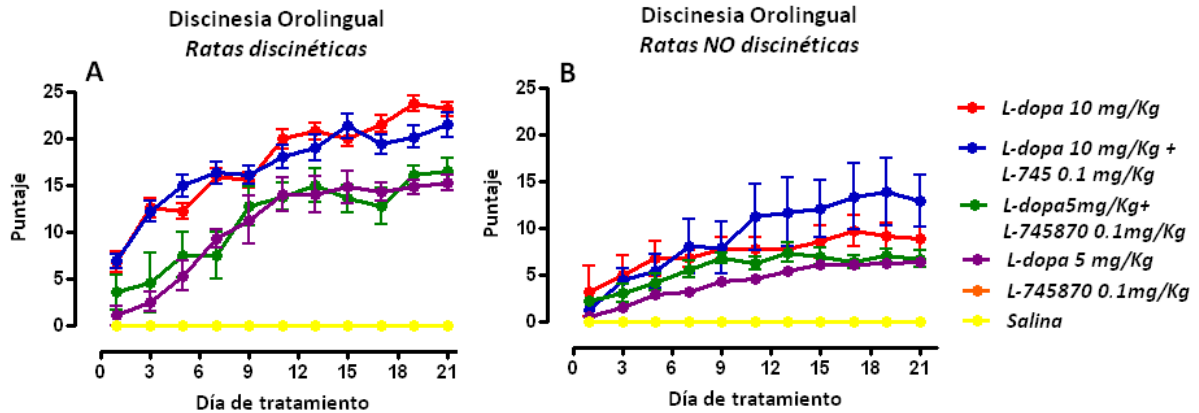


Gráfica 7. Curso temporal del puntaje total de discinesias axiales. Ratas discinéticas (A) y No discinéticas (B). Se grafica el promedio del puntaje total de discinesias de la última sesión para cada subgrupo de ratas. El puntaje de discinesias axiales se obtuvo de una evaluación de 3 horas a partir de la administración de cada fármaco.

En cuanto a los subgrupos de animales clasificados como no discinéticos, se observó que solo los grupos L-dopa 10 mg/Kg y L-dopa 10 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg presentaron leves discinesias axiales.

#### 6.4.2 Discinesia orolingual

Los puntajes finales de discinesias orolingual que se muestran en la gráfica 7A en las ratas discinéticas para los grupos de L-dopa 10 mg/Kg y L-dopa 10 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg fueron de  $22 \pm 8$  y  $24 \pm 7$  respectivamente, para los grupos de L-dopa 5 mg/Kg y L-dopa 5 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg fueron de  $15 \pm 5$  y  $16 \pm 6$  consecutivamente. Cabe señalar que el hecho de administrar la L-dopa en conjunto con el antagonista D4 L-745870 no cambió el desarrollo de la discinesia orolingual, así como tampoco cambio el puntaje final con significancia estadística en un análisis de varianza ANOVA realizado.

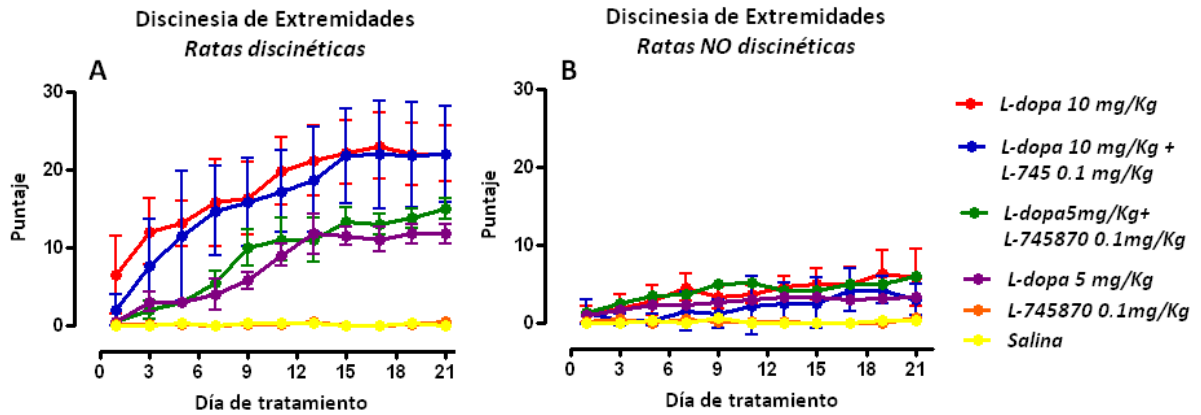


Gráfica 7. Curso temporal del puntaje total de discinesias orolinguales. Ratas discinéticas (A) y No discinéticas (B). Se graficó el promedio del puntaje de discinesias orolinguales de la última sesión para cada subgrupo de ratas. El puntaje se obtuvo de una evaluación de 3 horas a partir de la administración de cada fármaco.

En cuanto a los animales clasificados como no discinéticos a excepción de los grupos L-745,870 y salina, desarrollaron discinesias orolinguales levemente ascendentes durante el tratamiento, de las cuales se encontró diferencia estadística entre grupos L-dopa 10 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg y aquellos tratados con L-dopa 5 mg/Kg con y sin el antagonista de los receptores D4.

### 6.4.3 Discinesia de extremidades

En el caso de las ratas discinéticas el puntaje promedio del último día de los grupos L-dopa 10 mg/Kg y L-dopa 10 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg fueron de  $22 \pm 5$  y  $22 \pm 7$  respectivamente, el puntaje máximo del último día para el grupo L-dopa 5 mg/Kg fue de  $13 \pm 4$  y en el caso de L-dopa 5 mg/Kg + L-745870 0.1 mg/Kg fue de  $11 \pm 3$ , valor que no tuvo diferencia estadística con el antes mencionado. El progreso de las discinesias de extremidades fue en aumento para los cuatro grupos que incluían L-dopa en el tratamiento y tuvo diferencia estadística entre dosis distintas de L-dopa (Ver Gráfica 8).



Gráfica 8. Gráfica 7. Curso temporal del puntaje total de discinesias de extremidades.

Las ratas clasificadas como no discinéticas tuvieron puntajes en el último día de evaluación cercanos a los 4 puntos de cuyo valor no hubo diferencia estadística relevante para ningún grupo (Análisis de varianza de una vía ANOVA).

## **7. Discusión**

### **7.1 Activación de los receptores D4 durante el tratamiento con L-dopa**

La Sustancia Nigra Reticulada es la encargada de procesar la información para enviarla a la Corteza motora y Tálamo en el circuito de los Ganglios Basales. Su actividad autónoma rige en gran parte el estado de reposo de un individuo y su inhibición en pequeña o gran medida favorece el movimiento como resultado final. La inhibición de la SNr es producida por aquellas neuronas GABAérgicas que la inervan, de la vía directa en mayor proporción (65% Parent 1995) las proyecciones provenientes del Estriado; y de la vía indirecta los axones de la parte externa del Globo Pálido (40% Acosta 2010). Estas dos fuentes de GABA representan dos vías de regulación de la actividad de la SNr.

Durante la Enfermedad de Parkinson existe una actividad disminuida de las neuronas estriatales y una actividad incrementada de las neuronas palidales, por otra parte se sabe que existen cambios plásticos durante la denervación dopaminérgica como lo son los cambios de sensibilidad de los receptores a dopamina. Se ha mostrado evidencia de los cambios en proteínas de señalización del receptor D1 presentes en neuronas estriado-nigrales en denervación y en el trabajo de Rangel en 2010 en el tratamiento con L-dopa y cambios en la expresión del receptor D4 en terminales pálido-nigrales en denervación dopaminérgica (Acosta 2010). Los receptores D1 presentes en las terminales estriado-nigrales tienen como función aumentar la liberación de GABA en el núcleo de salida, mientras que los receptores D4 pálido-nigrales favorecen la inhibición de la liberación de GABA en el mismo.

Durante el tratamiento con L-dopa los receptores a dopamina son activados, lo que provoca que el individuo se mueva, esto es lo que se conoce como terapia de reemplazo, muy posiblemente todos los receptores a dopamina son activados, incluyendo los receptores D4 pálido-nigrales.

De acuerdo al abordaje de este proyecto logramos presentar un experimento muy sugerente acerca de la activación de los receptores D4, donde los animales que fueron tratados con L-dopa y el antagonista selectivo D4 tuvieron una facilitación para girar de manera contralateral a la lesión mayor que la de los animales tratados únicamente con L-dopa.

La conducta de giro inducida por L-dopa y que esta se incrementa con los días de tratamiento se explica por la sensibilización que provoca la denervación dopaminérgica sumada a aquella que produce el tratamiento con L-dopa, de tal forma que la actividad locomotora del animal se ve facilitada al lado contralateral a la lesión por dicha sensibilización. Al coadministrar el antagonista de los receptores D4 y L-dopa, es posible que el bloqueo del receptor D4 en primer lugar, este generando un gran aumento en la liberación de GABA en la SNr proveniente del GPe, que de manera concreta se sabe que esta aumentado y sensibilizado durante la denervación (Acosta 2010) lo que inhibiría en gran medida la inhibición de la liberación de GABA que fisiológicamente proporciona el receptor. En segundo lugar la activación por parte de la L-dopa sobre la vía directa puede generar liberación de GABA proveniente de las proyecciones estriatales hacia la SNr que inhibiría aun más los núcleos de salida. La cantidad de GABA en la SNr en esta situación es teóricamente mayor a la generada únicamente por la L-dopa lo que se ve reflejado a nivel conductual, facilitando el movimiento del lado que rigen estos núcleos sensibilizados por la denervación y el tratamiento, con lo que es posible especular que los receptores a dopamina D4 se están activando en el tratamiento con L-dopa. Esto también implica que es factible modular en un tratamiento combinado la cantidad de GABA liberada, dependiendo del grado de activación del receptor D1 y el bloqueo del receptor D4.

## **7.2 Efecto terapéutico del tratamiento crónico de dosis subterapéuticas de L-dopa en conjunto con el antagonista selectivo de los receptores D4 L-745,870**

El efecto terapéutico representa la recuperación parcial o total a causa de un fármaco, de una función fisiológica que se encuentra afectada. Durante la Enfermedad de Parkinson se pierde la capacidad de iniciar movimientos, se padecen temblores involuntarios y los pocos movimientos a realizar se tornan lentos.

La terapia más utilizada para esta enfermedad es la L-dopa que incluso desde la primera administración al paciente, este es capaz de moverse nuevamente y regular de forma voluntaria dichos movimientos. El efecto terapéutico producido por la L-dopa es verdaderamente sorprendente para los pacientes con Enfermedad de Parkinson, pero a pesar de esto el tratamiento con este fármaco produce a largo plazo graves efectos secundarios como las discinesias. De manera similar a la clínica, en el modelo de lesión dopaminérgica en rata con 6-OHDA se ha observado una deficiencia del animal por utilizar la extremidad correspondiente a la lesión, que si bien no es notoria por los mecanismos compensatorios de la actividad motora del animal, al realizar una prueba conductual puede evidenciarse. La prueba del cilindro es un ejemplo de lo anterior; dicha prueba consiste en colocar al animal en un cilindro de plástico transparente que se graba de la parte superior por un período de tiempo variable, de tal forma que por la conducta exploratoria de la rata, sea posible ver la extensión de sus patas delanteras sobre el cilindro y cuantificar los toques de cada extremidad para calcular un índice de uso de la extremidad correspondiente a la lesión con respecto a la normal.

En este modelo patológico el efecto terapéutico representaría la recuperación motora de la extremidad contralateral a la lesión, esto reflejado en el hecho de que el animal utilice de forma indistinta ambas extremidades. En el presente trabajo se ha mostrado una estrategia experimental que demostró la producción de un buen efecto terapéutico por la coadministración de dos fármacos en un modelo de denervación dopaminérgica.

La administración conjunta de una dosis baja o subterapéutica de L-dopa (5 mg/Kg) y un antagonista selectivo de los receptores D4 L-745,870 0.1 mg/Kg produjo un índice de asimetría casi cercano al 100%, que representa la utilización indistinta de las extremidades del animal. La recuperación motora en la extremidad contralateral a la lesión es clara y permite especular que los mecanismos intrínsecos de ambos fármacos sobre los núcleos cerebrales involucrados faciliten nuevamente el movimiento del animal durante el tratamiento crónico del mismo.

De primera instancia el bloqueo del receptor D4 favorecerá la liberación de GABA proveniente de las neuronas palidales hacia la sustancia nigra, este efecto sumado a la liberación de GABA generada por la activación de receptores D1 localizados en terminales estriado nigrales, produce una actividad motora adecuada que se equipara a la producida al lado normal, por lo tanto el índice no es estadísticamente diferente de 100. La cantidad de teórica de GABA necesaria para igualar la actividad motora del lado normal del animal, es lograda por dosis de 10 mg/Kg de L-dopa. Esta dosis se conoce como terapéutica y alcanza la recuperación funcional del animal, desafortunadamente el 7º de día de tratamiento aproximadamente se establecen las discinesias y se afecta la acción benéfica del fármaco. Se ha establecido actualmente por muchos aspectos un consenso de información a cerca de la génesis de las discinesias que involucra como principal responsable a la sensibilización de la vía directa por la denervación dopaminérgica y el tratamiento con L-dopa, en la clínica se sabe que la aparición de discinesias en pacientes depende en gran medida de la dosis de L-dopa que se les administra, por los datos obtenidos es posible proponer que la administración de L-dopa en dosis subterapéuticas y el antagonista de los receptores D4 podría producir un adecuado efecto terapéutico, aplazando la aparición de las discinesias y aumentando la calidad de vida de un paciente tratado con estos fármacos.



Es importante notar que otros posibles sitios de acción del antagonista de los receptores D4 podrían participar en la respuesta observada, al igual que la L-dopa. La L-dopa, por su parte activa todos los receptores dopaminérgicos del circuito, así es el caso de los receptores D2 de la vía indirecta y que potencian la acción de los receptores D1, sinergizando esta vía con la directa. Lo mismo se ha mostrado el aumento de expresión de receptores D3 en la sustancia nigra, que parece ser se expresan conjuntamente con receptores D1 de la vía directa antagonizando su actividad (Avalos 2011). Por su parte los receptores D4 se localizan en las terminales cortico-estriatales y su activación inhibe la liberación de glutamato (Gonzalez 2012), por lo tanto es probable que su activación provocara una disminución de la actividad motora y su bloqueo la estimulara, contribuyendo así a la acción a nivel de los núcleos de salida.

### **7.3 Efecto del tratamiento crónico de dosis subterapéuticas de L-dopa en conjunto con el antagonista selectivo de los receptores D4 L-745,870 sobre las discinesias inducidas y su incidencia.**

Las discinesias son movimientos involuntarios anormales causados por la administración crónica de L-dopa, se caracterizan por aparecer en lapsos de tiempo cortos y repetidos y aparecen de 5 a 6 años después de iniciado el tratamiento en el paciente. Algunos de estos movimientos son masticación repetitiva, movimiento oscilatorio de la mandíbula y gesticulación facial principalmente.

En la clínica se ha mostrado que la aparición de las discinesias depende de la dosis administrada de L-dopa, del tiempo de tratamiento del paciente y del paciente mismo. La sensibilización del circuito de los Ganglios Basales durante la denervación dopaminérgica y la adquirida con el tratamiento con L-dopa ha sido caracterizada a nivel experimental reproduciendo aspectos de la clínica importantes como las discinesias.

Los cambios a nivel molecular y celular que producen las discinesias no son completamente claros pero se sugieren varias teorías que resultan relevantes, entre ellas: La sensibilización de la vía de señalización del receptor D1 localizado en las terminales estriado-nigrales de la vía directa que produce excesivas cantidades de GABA liberado en los núcleos de salida, que estaría provocando los movimientos involuntarios en el individuo; aumento en la estimulación de la vía de las MAPK y también posiblemente un incremento en las enzimas capaces de sintetizar GABA en el Núcleo estriado. Todas las teorías propuestas para la generación de discinesias relacionadas con la vía directa del Circuito de los Ganglios Basales.

Uno de los principales objetivos del presente estudio fue evaluar el efecto de la administración de dosis conocidas como subterapéuticas de L-dopa en conjunto con un antagonista de los receptores a dopamina D4 sobre las discinesias en un modelo de lesión unilateral con 6-OHDA. Los datos obtenidos nos sugieren una participación notable e individual de la L-dopa para producir las discinesias ya que la administración del antagonista D4 L-745,870 no produce cambios en el desarrollo o la gravedad de las discinesias. De forma similar en cada tipo de discinesias la administración del fármaco adjunto a la L-dopa no produce cambios en su progreso durante el tratamiento crónico.

Por otro lado la disminución de la dosis de L-dopa a la mitad, reduce de forma significativa la población de animales discinéticos con respecto a los grupos administrados con la dosis conocida hasta el momento como terapéutica, así como también los puntajes máximos de discinesias de cada animal. Por lo anterior es posible que el tratamiento de la mitad de la dosis de L-dopa y L-745,870 permita a nivel clínico aplazar la aparición de discinesias en los pacientes pero también disminuir la gravedad de las mismas por la baja en la dosis de L-dopa.

La estimulación mediana de la vía directa por la L-dopa sumado al previo bloqueo del receptor D4 sensibilizado de la vía indirecta, producen la inhibición del complejo de salida que se traduce en la recuperación motora del animal como ya se ha mencionado antes, además de disminuir la incidencia de discinesias y la severidad de las mismas.

#### **7.4 Papel de receptor D4 en el tratamiento con L-dopa**

Aunque la implicación de los receptores a dopamina D1, D2 y D3 en las discinesias ha sido medianamente estudiada (Jenner 2008), el receptor D4 no ha sido involucrado con este proceso a pesar de su localización en núcleos de los Ganglios basales, los cuales son estructuras clave envueltas en procesos como Enfermedad de Parkinson y las discinesias (Wichman 2007). Debido a que los receptores D4 se encuentran localizados en el Núcleo estriado, GP y NST se cree que tienen un papel importante en el circuito de los Ganglios Basales. Existen estudios en modelos animales de Parkinson en roedor (Marin 2009) y primate (Gregoire 2009), donde se estudian fármacos no selectivos pero con actividad en los receptores D4. En estos animales se previene la discinesia inducida por L-dopa administrando sin embargo el sarizotan usado en estos experimentos que tiene un efecto benéfico sobre la disminución de discinesias en el modelo animal, no lo tuvo en la fase II del estudio clínico, esto probablemente a sus efectos sobre otros receptores no dopaminérgicos dada la presencia de sintomatología colateral.

El L-745,870 (3-([4-(4-chlorofenil) piperazin-1-il]metil)-1H-pirrol[2,3-b]piridina), es una molécula diseñada para tratar la esquizofrenia y su eficacia antipsicótica fue probada en estudios de fase II (Bristow 1997, Brotchie 2012). L-745,870 es un potente y selectivo antagonista de los receptores D4, tiene 1000 veces más afinidad por este receptor que por su siguiente blanco: el receptor D3 (Patel 1997). Aunque no produjo efectos benéficos para la esquizofrenia es un fármaco con alta seguridad, tolerabilidad y un excelente perfil farmacocinético.

El efecto del bloqueo del receptor D4 localizado en axones de Globo pálido, es favorecer la liberación de GABA de estas terminales, por un lado producirá la inhibición sobre el NST que no podrá activar al complejo de salida y por otra parte modulara la inhibición directa sobre la SNr. Ambos efectos se traducen a nivel funcional en favorecer la actividad motora del individuo. Sumado a este efecto el enfoque de nuestro trabajo incluye un tratamiento adjunto con L-dopa, que por su parte estimula mayormente a la vía directa, el uso de dosis bajas de este fármaco llevará a un efecto terapéutico con baja producción de discinesias de las que produce la dosis habitualmente usada y además la aparición de las mismas de forma más tardía.

También es importante tomar en cuenta, que los datos aquí mostrados representan los efectos de un modelo animal de la enfermedad, que puede no reflejar exactamente lo que ocurre en los pacientes, así mismo que los efectos a largo plazo del bloqueo del receptor como su desensibilización podrían influir en la respuesta en períodos más prolongados y en este sentido habrá que continuar realizando experimentos para responder esta preguntas y proporcionar más elementos útiles a tomar en cuenta para proponer su uso clínico.

En resumen los hallazgos de este trabajo sugieren que el papel del receptor D4 en el tratamiento con L-dopa del Parkinson experimental, puede ser prometedor a nivel clínico ya que permitiría al paciente recuperar su funcionalidad motora y un lapso de calidad de vida mayor con el uso de dos fármacos ampliamente conocidos y seguros.

## **8. Conclusiones**

- *El receptor D4 es activado durante el tratamiento con L-dopa.***
  
- *El tratamiento con dosis subterapéuticas de L-dopa en conjunto con el antagonista selectivo del receptor D4 favorece un efecto terapéutico adecuado y mantiene una baja incidencia de animales discineticos.***
  
- *El tratamiento con L-745870 no determina la aparición de discinesias.***

## 9. Bibliografía

- Acosta, J., Sierra, A., Escartin-Pere' z, R., Erlij, D., Aceves, J., Floran, B., (2008). D4 receptors inhibit depolarization-induced [3H]GABA release from pallido-nigral terminals. *Soc. Neurosci. Abstr.* 274.20/JJ15.
- Acosta-Garcia, J., Hernandez-Chan, N., Paz-Bermudez, F., Sierra, A., Erlij, D., Aceves, J. and Floran, B., (2009). D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 57, 725-730.
- Ávalos-Fuentes.(2011). Papel del receptor dopaminérgico D3, sobre la supersensibilidad en la vía Estriado-nigral inducida por denervación. Tesis de maestría.
- Bezard E, Gross CE, Qin L, Gurevich VV, Benovic JL, and Gurevich EV (2005). L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol Dis* 18:323–335.
- Bezard E, Stutzmann JM, Imbert C, Boraud T, Boireau A, Gross CE. (1998). Riluzole delayed appearance of parkinsonian motor abnormalities in a chronic MPTP monkey model. *Eur J Pharmacol.* 1998 Sep 4;356(2-3):101-4.
- Bezard, E., Brotchie, J.M., Gross, C.E., 2001. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 577–588.
- Bezard, E., Brotchie, J.M., Gross, C.E., 2001. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 577–588.
- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A., & Bevan, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of anatomy*, 196, 527–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1468095&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bristow, L.J., Collinson, N., Cook, G.P., Curtis, N., Freedman, S.B., Kulagowski, J.J., Leeson, P.D., Patel, S., Ragan, C.I., Ridgill, M., Saywell, K.L. and Tricklebank, M.D., 1997. L-745,870, a subtype selective dopamine D4 receptor antagonist, does not exhibit a neuroleptic-like profile in rodent behavioral tests. *J Pharmacol Exp Ther* 283, 1256-1263.
- Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, and Carlsson ML (2001). Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:237–260.
- Carvelli, L., Moro, A., Kahlig, K. M., Ferrer, J. V., Sen, N., Lechleiter, J. D., Leeb-lundberg, L. M. F., et al. (2002). PI 3-kinase regulation of dopamine uptake, 859-869.
- Cenci, M.A., Lee, C.S., Bjorklund, A., (1998) L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2694–2706.
- Cenci, M.A., Tranberg, A., Andersson, M., Hilbertson, A., (1999) Changes in the regional and compartmental distribution of FosB- and JunB-like immunoreactivity induced in the dopamine-denervated rat striatum by acute or chronic L-dopa treatment. *Neuroscience* 94, 515–527.
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, and Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9:53–58.
- Debeir, T., Ginestet, L., Franc, C., Chopin, P., Marien, M., Colpaert, F., & Raisman-vozari, R. (2005). Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Experimental Neurology*, 193, 444 - 454.
- E. Shink\*, M.D. Bevan†, J.P. Bolam†, Y. Smith. (1996). The subthalamic nucleus and the external pallidum: two tightly interconnected structures that control the output of the basal ganglia in the monkey. Section of Neurosurgery, Dartmouth Medical School, Lebanon, NH, USA. [kendall.h.lee@hitchcock.org](mailto:kendall.h.lee@hitchcock.org).

- Erlj, D., Acosta-García, J., Rojas-Márquez, M., González-Hernández, B., Escartín-Perez, E., Aceves, J., & Florán, B. (2012). Dopamine D4 receptor stimulation in GABAergic projections of the globus pallidus to the reticular thalamic nucleus and the substantia nigra reticulata of the rat decreases locomotor activity. *Neuropharmacology*, 62(2), 1111–8. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.11.001
- Fiorentini C, Busi C, Spano P, and Missale C (2010) Dimerization of dopamine D1 and D3 receptors in the regulation of striatal function. *Curr Opin Pharmacol* 10:87–92.
- Floran, B., Floran, L., Erlj, D. and Aceves, J., 2004. Activation of dopamine D4 receptors modulates 3H GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus. *Neuropharmacology* 46, 497-503.
- Floran, B., Floran, L., Erlj, D., Aceves, J., (2004a). Activation of dopamine D4 receptors modulates 3H GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus. *Neuropharmacology* 46, 497–503.
- Floran, B., Floran, L., Erlj, D., Aceves, J., (2004b). Dopamine D4 receptors inhibit depolarization-induced GABA release in the rat subthalamic nucleus. *Eur. J. Pharmacol.* 498, 97–102.
- Flores, G., Liang, J.J., Sierra, A., Martinez-Fong, D., Quirion, R., Aceves, J., Srivastava, L.K., 1999. Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience* 91, 549–556
- Flores-Hernández J, Cepeda C, Hernández-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P, and Levine MS (2002) Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* 88:3010–3020.
- Fornaretto MG, Caccia C, Caron MG, Fariello RG.(1993). Dopamine receptors status after unilateral nigral 6-OHDA lesion. Autoradiographic and in situ hybridization study in the rat brain.
- Gerfen CR (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neuroscience* 23:S64–S70.
- Gerfen CR.(2003). D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum animal model of Parkinson's disease. *Neuroscientist*. 2003 Dec;9(6):455-62.
- Gerfen, C. R., Miyachi, S., Paletzki, R., & Brown, P. (2002). D1 Dopamine Receptor Supersensitivity in the Dopamine-Depleted Striatum Results from a Switch in the Regulation of ERK1 / 2 / MAP Kinase. *Electrophoresis*, 22(12), 5042-5054.
- González S, C Rangel-Barajas, M Peper, R Lorenzo, E Moreno, F Ciruela, J Borycz, J Ortiz, C Lluís, R Franco, P J McCormick, N D Volkow, M Rubinstein, B Floran and S Ferré. (2012). Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Molecular Psychiatry* 17, 650-662 (June 2012) | doi:10.1038/mp.2011.93.
- Graziane, N. M., Yuen, E. Y., & Yan, Z. (2009). Dopamine D 4 Receptors Regulate GABA A Receptor Trafficking via an Actin / Cofilin / Myosin-dependent Mechanism . *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8329 -8336.
- Hernandez, A., Ibanez-Sandoval, O., Sierra, A., Valdiosera, R., Tapia, D., Anaya, V., Galarraga, E., Bargas, J., Aceves, J., 2006. Control of the subthalamic innervation of the rat globus pallidus by D2/3 and D4 dopamine receptors. *J. Neurophysiol.* 96, 2877–2888.
- Iversen SD and Iversen LL (2007) Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neuroscience* 30:188–193.
- Jenner, P. (2008). Functional Models of Parkinson ' s Disease : A Valuable Tool in the Development of Novel Therapies. *Annals of Neurology*, 16-29.
- Joseph JD, Wang YM, Miles PR, Budygin EA, Picetti R, Gainetdinov RR, Caron MG, and Wightman RM (2002) Dopamine autoreceptor regulation of release and uptakemin mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. *Neuroscience* 112:39–49.
- Katz, J., Nielsen, K.M., Soghomonian, J.J., 2005. Comparative effects of acute or chronic administration of levodopa to 6-hydroxydopamine-lesioned rats on the expression of glutamic acid decarboxylase in the neostriatum and GABAA receptors subunits in the substantia nigra, pars reticulata. *Neuroscience* 132, 833–842.

- Kliem, M. A., Maidment, N. T., Ackerson, L. C., Chen, S., Smith, Y., Wichmann, T., Kliem, M. A., et al. (2012). Activation of Nigral and Pallidal Dopamine D1-Like Receptors Modulates Basal Ganglia Outflow in Monkeys Activation of Nigral and Pallidal Dopamine D1-Like Receptors Modulates Basal Ganglia Outflow in Monkeys. *Journal of Neurophysiology*, (July 2007), 1489-1500.
- Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lanc,a AJ, O'Dowd BF, and George SR (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* **279**:35671–35678.
- Lezcano, N., Lezcano, N., Mrzljak, L., Eubanks, S., Levenson, R., Goldman-rakic, P., & Bergson, C. (2012). Dual Signaling Regulated by Calcyon , a D1 Dopamine Receptor Interacting Protein. *Science*, *1660*(2000).
- Marin C, Aguilar E, Rodríguez-Oroz MC, Bartoszyk GD, Obeso JA.(2009). Local administration of sarizotan into the subthalamic nucleus attenuates levodopa-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009 Jun;204(2):241-50. Epub 2009 Jan 22.
- Maurice, N., Deniau, J.-michel, Glowinski, J., Thierry, A.-marie, Cedex, P., & Curie, M. (1998). Relationships between the Prefrontal Cortex and the Basal Ganglia in the Rat : Physiology of the Corticosubthalamic Circuits. *Direct*, *18*(22), 9539-9546.
- Mela, F., Marti, M., Dekundy, A., Danysz, W., Morari, M., Cenci, M.A., (2007) Antagonism of metabotropic glutamate receptor type 5 attenuates L-DOPA-induced dyskinesia and its molecular and neurochemical correlates in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 101, 483–497.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, and Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**:189–225.
- Neve KA, Seamans JK, and Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* **24**:165–205.
- Oak JN, Oldenhof J, Van Tol HH. (2000). The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *Eur J Pharmacol.* 2000 Sep 29;405(1-3):303-27.
- Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* **20**:128–154.
- Parent A, Paré D, Smith Y, Steriade M. (1988). Basal forebrain cholinergic and noncholinergic projections to the thalamus and brainstem in cats and monkeys. *J Comp Neurol.* 1988 Nov 8;277(2):281-301.
- Patel, S., Freedman, S., Chapman, K.L., Emms, F., Fletcher, A.E., Knowles, M., Marwood, R., Mcallister, G., Myers, J., Curtis, N., Kulagowski, J.J., Leeson, P.D., Ridgill, M., Graham, M., Matheson, S., Rathbone, D., Watt, A.P., Bristow, L.J., Rupniak, N.M., Baskin, E., Lynch, J.J. and Ragan, C.I., 1997. Biological profile of L-745,870, a selective antagonist with high affinity for the dopamine D4 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **283**, 636-647.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.
- Rangel Barajas, C.R., Siva, I., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., (2009) L-DOPA induced dyskinesia modify expression and activity of adenylyl cyclase V/VI in striato-nigral terminals of the rat. *Neurosci. Abstr.* 630.k7.
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., Garcia-Ramirez, M., Sanchez-Lemus, E., Floran, L., Aceves, J., Erlij, D., Floran, B., (2008) 6-OHDA-induced hemiparkinsonism and chronic L-DOPA treatment increase dopamine D1-stimulated GABA release and [(3)H]-cAMP production in substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* **55**, 704–711.
- Rankin ML, Hazelwood LA, Free RB, Namkung Y, Rex EB, Roof RA and Sibley DR (2010) Molecular pharmacology of the dopamine receptors, in *Dopamine Handbook* (Iversen LL, Dunnett SB, Iversen SD, Bjorklund A ed) pp 63–87, Oxford University Press, New York.
- Rivera A, Trías S, Peñafiel A, Angel Narváez J, Díaz-Cabiale Z, Moratalla R, de la Calle A.(2003). Expression of D4 dopamine receptors in striatonigral and striatopallidal neurons in the rat striatum. *Brain Res.* 2003 Oct 31;989(1):35-41.
- Rondou P, Haegeman G, and Van Craenenbroeck K (2010) The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci* **67**:1971–1986.



- Schelkun, R. M., Yuen, P.-wai, Serpa, K., Meltzer, L. T., Wise, L. D., Whittemore, E. R., & Woodward, R. M. (2000). Subtype-Selective N-Methyl- D -aspartate Receptor Antagonists: Benzimidazole and Hydantoin as Phenol Replacements. *Optimization*, (5), 1892-1897.
- Sibley DR (1999) New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**:313–341.
- Sidibé M, Bevan MD, Bolam JP, Smith Y. (2000) Efferent connections of the internal globus pallidus in the squirrel monkey: I. Topography and synaptic organization of the pallidothalamic projection. *Comp Neurol*. 1997 Jun 9;382(3):323-47.
- Snyder SH, Taylor KM, Coyle JT, and Meyerhoff JL (1970) The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry* **127**:199–207.
- Sokoloff P, Diaz J, Le Foll B, Guillin O, Leriche L, Bezard E, and Gross C (2006) The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **5**:25–43.
- Swanson-Park JL, Coussens CM, Mason-Parker SE, Raymond CR, Hargreaves EL, Dragunow M, Cohen AS, Abraham WC. (1999). A double dissociation within the hippocampus of dopamine D1/D5 receptor and beta-adrenergic receptor contributions to the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience*. 1999;92(2):485-97.
- Usiello, A., Baik, J.-hyun, Picetti, R., & Dierich, A. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 408(November).
- Vallone D, Picetti R, and Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* **24**:125–132.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, and Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **350**:610–614.
- Wichmann T, DeLong MR (2003) Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 991:199–213.
- Wichmann T, DeLong MR. (2008). Anatomy and physiology of the basal ganglia: relevance to Parkinson's disease and related disorders. *Handb Clin Neurol*. 2007;83:1-18.
- Windels, F., Kiyatkin, E.A., (2006). Dopamine action of the substantia nigra pars reticulata: iontophoretic studies in awake, unrestrained rats. *Eur. J. Neurosci*. 24, 1385–1394.