



Microencapsulación de factores neurotróficos: aplicación al tratamiento de la enfermedad de Parkinson

Microencapsulation of neurotrophic factors: application in Parkinson's disease

Garbayo Atienza E.¹, Ansorena E.¹,
Lanciego Pérez J.L.², Aymerich Soler M.S.²,
Blanco-Prieto M.J.¹

¹ Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica. Facultad de Farmacia.
² Laboratorio de Neuromorfología y Trazadores CIMA
Universidad de Navarra.

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad degenerativa, lentamente progresiva caracterizada por temblor de reposo, cara inexpresiva, rigidez, lentitud al iniciar y practicar movimientos voluntarios. Neuropatológicamente se caracteriza por pérdida de células dopaminérgicas en la sustancia nigra lo cual conlleva déficit en el suministro de dopamina a nivel de ganglios basales.

Los factores de crecimiento nervioso, o factores neurotróficos, que respaldan la supervivencia, crecimiento y desarrollo de las células cerebrales, son un tipo de terapia prometedor para la enfermedad de Parkinson. Se ha demostrado que el GDNF, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, protege las neuronas de dopamina y promueve su supervivencia en los modelos animales de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, la administración de proteínas en el cerebro no está exenta de dificultades, por ello, el sistema elegido para administrar el GDNF en el cerebro será uno de los puntos clave para el éxito del tratamiento. En este sentido, el uso de micropartículas formuladas a partir de polímeros biodegradables parece ser la estrategia más apropiada.

En nuestro grupo de investigación hemos desarrollado un protocolo de expresión y purificación de GDNF en células eucariotas de mamífero. El objetivo de este estudio es la microencapsulación de la proteína en partículas biodegradables.

Palabras clave:

GDNF, micropartículas, enfermedad de Parkinson, polímeros biodegradables, liberación controlada.

ABSTRACT

Parkinson disease (PD) is a slowly progressing, degenerative disease characterized by resting tremor, expressionless face, rigidity and slowness in initiating and performing voluntary movements. Neuropathologically, PD is characterized by loss of dopaminergic cell bodies in the substantia nigra, resulting in a reduced supply of dopamine in the basal ganglia. Recently, it has been demonstrated that GDNF, a glial-derived neurotrophic factor is able to protect the dopaminergic neurons of the substantia nigra and it can also induce regeneration of injured neurons in the central nervous system in vivo. However, there are many difficulties in the delivery of proteins into the brain that's why a method for achieving their administration in precise areas of the brain will be a keypoint in the success of the treatment. In this sense, biodegradable microparticles could represent a very interesting strategy.

In our group, we have developed a procedure for the expression and purification of GDNF using a mammalian cell system. The aim of the present work is the GDNF microencapsulation into biodegradable particles.

Key words:

GDNF, microparticles, Parkinson's disease, biodegradable polymers, controlled release.

MAPFRE MEDICINA, 2007; 18 (4): 240-248

Correspondencia:

M. J. Blanco-Prieto. Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra
Irunlarrea, 1. 31080 Pamplona
mjblanco@unav.es



INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta al 1% de la población por encima de los 55 años de edad. A nivel histopatológico, se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra compacta (SNc) seguida de una marcada caída de los niveles de dopamina en el cuerpo estriado (su principal núcleo diana en el cerebro) y por la presencia de inclusiones intracitoplásmicas denominadas cuerpos de Lewy. Las principales características clínicas de la enfermedad vienen representadas por la aparición de temblor, bradicinesia, acinesia, rigidez e inestabilidad postural. La evolución a largo plazo incluye la aparición de demencia en un número muy significativo de pacientes. En la actualidad, la terapia sustitutiva con dopamina es el tratamiento de elección, situando al paciente en la llamada «luna de miel farmacológica», un periodo en el que el paciente es controlado satisfactoriamente con la medicación. A medida que la enfermedad progresa aparecen síntomas derivados de efectos adversos de la medicación, así como síntomas no dependientes de la terapia farmacológica. Debido a que la expectativa de vida del paciente parkinsoniano es similar a la de la población general, los enfermos de EP deben afrontar durante muchos años una pléyade de síntomas muchos de ellos muy adversos y que afectan seriamente su calidad de vida.

Por todo lo anteriormente expuesto, es necesario diseñar nuevas perspectivas terapéuticas tendientes a detener o ralentizar la pérdida neuronal progresiva en SNc. Este es el objetivo de las terapias neuroprotectoras. De entrada, la pretendida neuroprotección requiere de un diagnóstico precoz que permita una intervención temprana en el curso de la enfermedad para salvaguardar de la muerte celular el mayor número posible de neuronas dopaminérgicas. Intervenciones ulteriores encaminadas a reconstruir el sistema nigroestriado dopaminérgico (con o sin efecto neuroprotector sobre las neuronas que aún sobrevivan) deben ser consideradas como estrategias neurorestauradoras o neuroregenerativas, siendo ambas un objetivo más plausible que el puramente neuroprotector en el estado actual de los conocimientos sobre la EP.

A la hora de diseñar procedimientos neuroprotectores en EP en primer lugar es necesario una reflexión para escoger adecuadamente el modelo animal en el que se va a testar dicha terapia. Afortunadamente, en EP contamos con modelos en rata que reproducen muy adecuadamente los trastornos principales de EP en el humano (para revisión sobre modelos animales de EP en neuroprotección, ver Emborg, 2004 (1)). Seguidamente, es necesario escoger el agente que vamos a emplear en estos estudios. Desde hace unos años, ha sido identificado el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) como proteína muy prometedora para acometer estos estudios. Se conoce que GDNF tiene un efecto especialmente trófico en las neuronas del sistema dopaminérgico (2-4). Las restantes cuestiones son absolutamente críticas y tienen que ver por un lado con la diana elegida para dicha liberación y por otro con el método de liberación escogido. Respecto a la zona cerebral diana del tratamiento, diversos estudios han obtenido resultados muy prometedores inyectando GDNF en el estriado en ratones (5), ratas (4,6,7-12), primates (13-18) y humanos (19). Otros estudios con GDNF han tomado como diana a SNc empleando ratas y monos (3,5,15, 17,18,20-22). Finalmente, una tercera vía de administración que produce resultados favorables es la inyección directa de GDNF en el ventrículo lateral cerebral, en estudios realizados en ratas, primates y humanos (14,23-25).

Los estudios anteriores han llevado a cabo la liberación de GDNF por medio de dos diferentes estrategias, principalmente: Un amplio grupo de estudios en diferentes sujetos experimentales (ratón, rata, primate y humano) han empleado la inyección directa de la proteína GDNF «desnuda» en la diana escogida (3-9,13,14,19-26), en tanto que otros grupos han empleado en ratas y monos un vector viral que codifica para GDNF (10, 11, 15-18). Otras dos posibilidades de administración empleadas menos frecuentemente comprenden el uso de fibroblastos modificados genéticamente para expresar GDNF (2), así como GDNF encapsulado en microesferas (27-28).

De todos los estudios mencionados cabe destacar principalmente el llevado a cabo por grupo de Steven S. Gill del Instituto de Neurociencias del Hospital Frenchay, de la universidad inglesa

de Bristol (19). En dicho estudio, utilizando un catéter, la proteína fue administrada cada día durante 18 meses en el putamen cerebral de cinco pacientes con EP en estado avanzado. Después de un año de tratamiento, los pacientes mostraron una mejoría del 39 por ciento en cuanto a su capacidad motriz, y de un 61 por ciento en la actitud para efectuar sus actividades cotidianas. Estos prometedores resultados no se vieron confirmados posteriormente en un estudio «doble ciego» patrocinado por AMGEN cuyos autores señalan que muy probablemente sea debido a problemas derivados de la dosificación y a la propia infusión directa. Los investigadores de este estudio señalaron la necesidad del desarrollo de mejores sistemas de suministro. En este sentido, una alternativa ideal para evitar estos inconvenientes sería el administrar el GDNF utilizando vectores poliméricos biodegradables como por ejemplo las micropartículas. En estos sistemas los compuestos biológicamente activos se encuentran atrapados en su interior. La administración del GDNF en un vector polimérico como las micropartículas permite reducir su dosis efectiva y su esquema de dosificación. Así, consiguen evitarse posibles efectos adversos y desde un punto de vista económico, rebajar considerablemente los costes de los tratamientos. Estos vectores constituyen una alternativa muy interesante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EP, ya que pueden administrarse fácilmente en áreas muy concretas del cerebro mediante una cirugía estereotáxica. Estos sistemas actúan como reservorio del GDNF y, además de proteger la proteína, la van liberando de forma controlada en el lugar designado durante semanas e incluso meses (29).

Debido a la baja pureza y al elevado coste del GDNF comercial nuestro grupo de investigación se planteó la necesidad de producirlo y purificarlo (30).

El siguiente paso y objetivo de este trabajo es el diseño y desarrollo de vectores poliméricos (micropartículas) conteniendo GDNF, formulados a partir de polímeros biodegradables. Estos vectores serán en primer lugar caracterizados *in vitro*, evaluándose posteriormente su eficacia en cultivos celulares. El objetivo final será la administración de los vectores, conteniendo el factor neuro-

trófico, en el estriado de ratas tratadas unilateralmente con 6-OHDA (hidroxi-dopamina) para inducirles un cuadro parkinsoniano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las micropartículas

Las micropartículas se prepararon con polímeros biodegradables y biocompatibles de tipo PLA (ácido poli-láctico) y PLGA (copolímero de ácido láctico y glicólico). Estos polímeros forman parte de medicamentos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en humanos.

Las formulaciones fueron preparadas utilizando el TROMS por el método de la evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión múltiple de tipo $A_1/O/A_2$, siendo A_1 la fase acuosa interna, O la fase orgánica y A_2 la fase acuosa externa.

Se describe a continuación el procedimiento y aparato para la producción de micropartículas por TROMS. Se trata de un nuevo sistema de fabricación de micropartículas basado en la inyección turbulenta de dos fases y posterior evaporación del disolvente orgánico utilizado. Este método de fabricación tiene lugar en un aparato denominado TROMS o «Total Recirculation One-Machine System» (Sistema Monobloque de Recirculación Completa).

La Figura 1 recoge un esquema del TROMS. Dicho sistema consta de un sistema de bombeo que está conectado a una válvula multivía de la

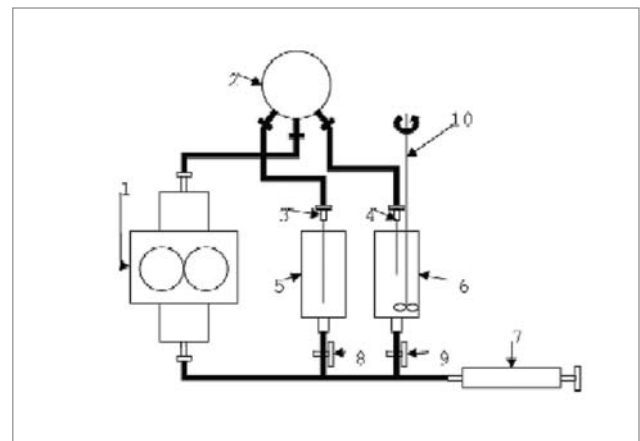


Fig. 1. Esquema del TROMS.



que salen 2 agujas. La primera de ellas se encuentra dentro de la primera vasija de mezclado y la otra en la segunda vasija de mezclado. Mediante una jeringa de vidrio con émbolo de teflón se incorpora al sistema la fase orgánica. Las vasijas de mezclado están conectadas a la bomba a través de dos válvulas. El mecanismo de agitación puede incorporarse al sistema o bien ser ajeno al mismo.

Se preparan las fases según la formulación deseada. Se ajusta el flujo de la bomba (ml/min) y se procede a la selección de las agujas. En la primera vasija de mezclado se introduce la fase acuosa A1, que contiene el fármaco o el material a encapsular. Se acciona el sistema de bombeo manteniendo cerradas las válvulas que conectan las vasijas de mezcla con la bomba, de tal forma que a través de la jeringa se introduce la fase O, que contiene el polímero formador de las micropartículas. La válvula multivía que permite la inyección turbulenta a través de la aguja 3. La fase O es, por tanto inyectada de forma turbulenta sobre la fase A1. Inicialmente se forma, dentro de la vasija 5, una emulsión O/A que rápidamente se invierte en una emulsión A/O dado que el volumen de la fase O es sustancialmente mayor que el de la fase A1. En este momento se abre la válvula 8 y se permite que la emulsión formada recircule a través del sistema durante un periodo de tiempo suficiente para que la emulsión sea homogénea (este periodo depende del volumen de emulsión formado). Una vez la emulsión A1/O es homogénea, se cambia la posición de la aguja multivía 2 para que la mezcla pase a través de la aguja 4. Se inyecta así la emulsión A1/O en la vasija 6 que contiene la fase acuosa A2. La inyección turbulenta hace que se forme la emulsión A1/O/A2 dentro de la vasija. Se cierra la válvula 8 y se abre la 9 para permitir la recirculación total de la mezcla, durante un periodo de tiempo suficiente para que la emulsión tenga un tamaño de gota homogéneo. Tras ese tiempo, la emulsión múltiple se deja agitando a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del disolvente de la fase O, mediante un agitador de hélice 10. Esta operación puede realizarse en el mismo aparato, incorporando en la vasija 6 el agitador de hélice, o bien mediante un sistema de agitación ajeno al aparato. La evaporación del disolvente orgánico lleva consigo la formación de las micropartículas,

que contienen en su interior la fase A1, donde se encuentra el GDNF.

Para la formulación de las micropartículas de GDNF se han ensayado polímeros de distinto peso molecular (Resomer RG 502, Resomer RG 503 y la mezcla de los 2 polímeros) y con variabilidad en su grado de hidrofilia lo que condicionó las características finales de las micropartículas ya que aquellos polímeros de mayor peso molecular reducen la liberación inicial del producto encapsulado, mientras que los más hidrofílicos experimentan una degradación más rápida y por lo tanto una liberación más inmediata.

La composición de las fases variaba en cada caso, si bien pueden establecerse las siguientes generalidades. La fase A1 estaba formada por tampón fosfato pH 7.9, el factor neurotrófico a encapsular, albumina y PEG. La fase orgánica O estaba formada por una mezcla de diclorometano y acetona en proporción 3:1 en la que se disolvió el polímero formador de las micropartículas. La fase A2 fue una solución de un viscosizante en agua.

Una vez formada la emulsión el procedimiento general de evaporación, lavado y liofilización de las micropartículas fue el siguiente: la emulsión se mantuvo bajo agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente. Las micropartículas obtenidas se lavaron 3 veces con 10 ml de agua mediante sucesivas centrifugaciones a 21.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se resuspendieron en agua, se congelaron a -80°C y se liofilizaron.

Caracterización de las micropartículas

Una vez obtenidas las partículas se caracterizaron en cuanto a tamaño y morfología. El tamaño de las micropartículas se determinó por espectroscopia de correlación fotónica usando un Mastersizer® (Malvern Instruments). Para ello se diluyó una cantidad suficiente de micropartículas en agua (rango de obscuración comprendido entre el 10 y el 30%). Las medidas se realizaron por triplicado. La morfología de las micropartículas fue examinada por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Además se determinó el porcentaje de encapsulación del GDNF: La cantidad de GDNF encapsulada en las micropartículas fue cuantificada mediante ELISA. Para ello las partículas se rom-

pieron en un disolvente apropiado y se extrajo la proteína añadiendo una solución acuosa.

También se estudió el perfil de liberación de la proteína *in vitro*. Para ello, una cantidad conocida de partículas se incubó a 37°C en un tampón fosfato de pH 7,4 y a intervalos previamente determinados se centrifugaron las muestras para cuantificar en el sobrenadante el GDNF liberado (mediante ELISA).

Estudios de la actividad del GDNF microencapsulado en cultivos celulares

Con éste ensayo se pretende evaluar si el GDNF encapsulado así como el liberado a partir de las micropartículas se mantiene en su forma activa. Para ello se ha escogido una línea celular, PC-12, obtenida a partir de un feocromocitoma de rata. Éstas células se caracterizan por tener una morfología redondeada y poco diferenciada que en presencia de factores neurotróficos (como el GDNF) cambia hacia un fenotipo de tipo neuronal que consiste en el crecimiento de neuritas ramificadas. Mediante RT-PCR se ha comprobado que éstas células poseen los dos receptores necesarios para que el GDNF pueda ejercer su acción: RET y GFR·1 (30). Además, nuestro grupo ha comprobado que en presencia de la proteína desnuda en el medio de cultivo, las células PC-12 experimentan un proceso de diferenciación neuronal con el consiguiente crecimiento de neuritas, en un proceso que es dosis dependiente (30).

El ensayo de diferenciación se realizó en placas de 12 pocillos, con 20 células/mm² en 1 ml de medio. Tras 24 horas se añadieron los distintos tratamientos por duplicado y se estudió el crecimiento axonal tras 7 días de tratamiento. Como control positivo se añadió a las células una solución estándar de GDNF a distintas concentraciones (de 0.1 a 50 ng/ml). Al mismo tiempo las células fueron adicionadas con alícuotas de los medios de liberación de las micropartículas a distintos tiempos (30 min, 24 h, y 7, 14, 21 y 28 días) así como el GDNF extraído de las micropartículas para confirmar la actividad del GDNF encapsulado y liberado. La respuesta celular al GDNF se determinó como el porcentaje de células que posean neuritas de un total de 200 células escogidas al azar y en varios campos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las micropartículas

Tamaño de las micropartículas y del rendimiento del proceso

El diámetro de las micropartículas obtenidas osciló entre 20 y 25 µm (independientemente del polímero utilizado en la formulación). Este tamaño es compatible con una administración en el cerebro mediante estérotaxia.

El rendimiento del proceso de fabricación, expresado en %, se determinó aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{(mg micropartículas obtenidos/ mg iniciales de polímero)}}{\text{X 100}}$$

Los resultados obtenidos mostraron un rendimiento del proceso que varió entre el 62 y el 88%.

Análisis de la emulsión múltiple y morfología de las micropartículas

En los estudios de evaluación del procedimiento de fabricación de micropartículas se analizó el aspecto de la emulsión múltiple obtenida mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, una vez obtenidas las micropartículas, estas fueron incubadas con un colorante fluorescente tal como la rodamina. La Figura 2 muestra el aspecto de las micropartículas. Todas las formulaciones obtenidas mostraron un aspecto homogéneo en cuanto a la formación de la emulsión y al tamaño de las gotículas internas.

La morfología de las micropartículas se analizó realizando fotografías de las mismas por micros-

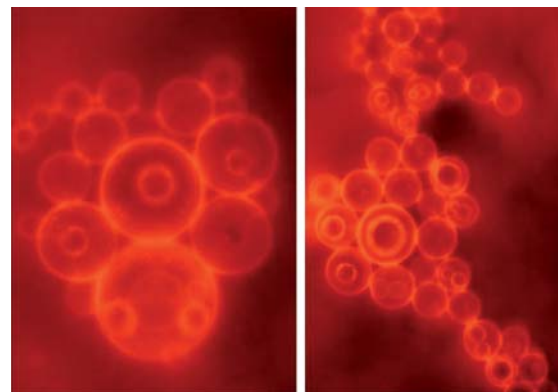


Fig. 2. Análisis del aspecto de la emulsión múltiple por microscopía de fluorescencia.

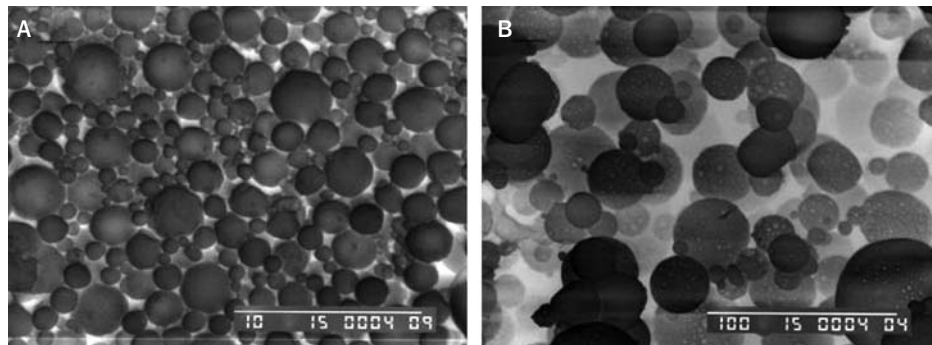


Fig. 3. Análisis de la morfología de las micropartículas por microscopía electrónica de barrido.

copía electrónica de barrido (SEM). Los resultados se muestran en la Figura 3.

Tanto las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia como las obtenidas por microscopía electrónica de barrido nos permitieron confirmar el tamaño que previamente había sido determinado por difracción de láser y que oscila en torno a las 25 micras.

Eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación es el porcentaje de principio activo encapsulado en relación a la cantidad inicial. Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$EE (\%) = (Q_{\text{encapsulada}} / Q_{\text{inicial}}) \times 100$$

donde Q_{inicial} es la cantidad inicial de principio activo por mg de polímero formador de micropartículas y $Q_{\text{encapsulada}}$ es la cantidad de principio activo encapsulada por mg de micropartículas.

La eficacia de encapsulación varió según la composición de las fases. Cuando la cantidad de GDNF a encapsular era baja (1 μg) se obtuvieron valores elevados de eficacias de encapsulación (próximos al 100%). Al aumentar la cantidad de

GDNF a encapsular disminuyeron las eficacias de encapsulación sin embargo en ningún caso fueron inferiores al 60%.

Estudio de la actividad del GDNF encapsulado

Para comprobar que el factor neurotrófico no se degradaba durante el proceso de fabricación de las micropartículas, se estudió la actividad del GDNF encapsulado por comparación con la actividad biológica de una cantidad conocida de dicha proteína. La respuesta de las células PC-12 al GDNF fue estudiada tras 7 días de tratamiento.

Como control positivo del estudio se utilizaron 5 mg de micropartículas vacías y una cantidad conocida de GDNF. Para el control negativo se utilizaron únicamente micropartículas vacías.

Los resultados (Figura 4) muestran que el GDNF no perdía su actividad durante el proceso de fabricación de las micropartículas. Tanto en el control positivo como en las células tratadas con GDNF encapsulado se observa el crecimiento de neuritas. El GDNF encapsulado produce sobre las células PC-12 el mismo efecto que el control

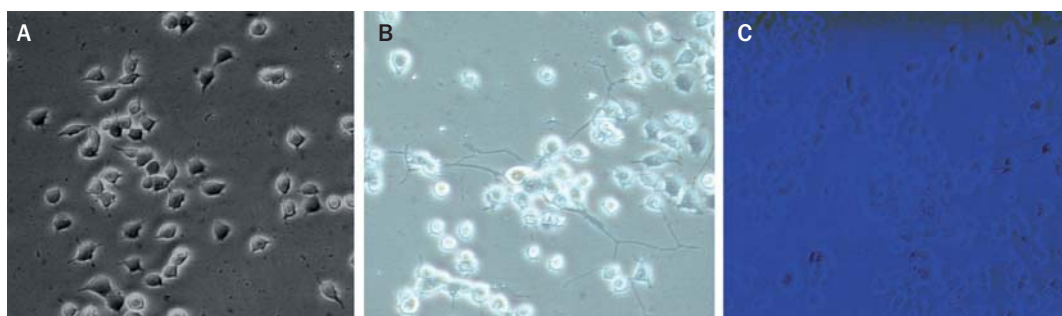


Fig. 4. Ensayo de diferenciación de células PC-12. (A) Control negativo (B) Control positivo y (C) Tratamiento con GDNF liberado de las micropartículas.

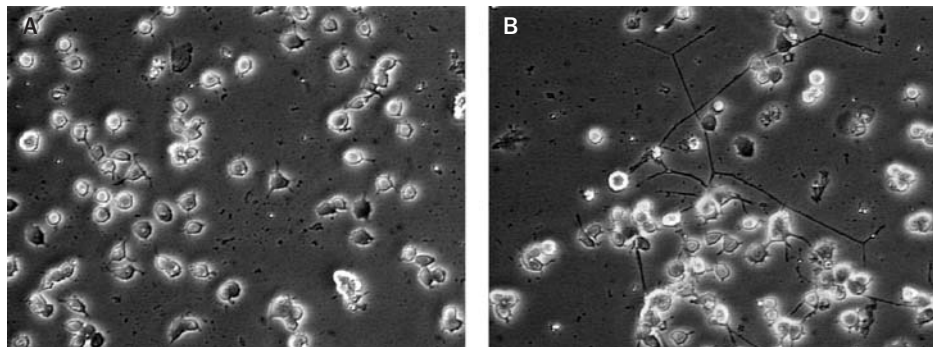


Fig. 5. Ensayo de diferenciación de células PC-12 A) Control negativo y B) Células PC-12 tratadas con GDNF liberado de las micropartículas.

positivo indicando que no pierde su actividad durante la preparación de las formulaciones.

Estudios de liberación *in vitro*

Las mejores formulaciones en cuanto a eficacia de encapsulación fueron seleccionadas y se estudió la liberación *in vitro* del GDNF encapsulado.

El GDNF liberado se cuantificó por ELISA y se comprobó la actividad del factor neurotrófico liberado mediante un ensayo de diferenciación de células PC-12 como el anteriormente descrito.

Los resultados mostraron que las micropartículas liberaban un 20% de la proteína a las pocas horas de incubación y al cabo de un mes el GDNF liberado fue de aproximadamente el 60%. Por otro lado se comprobó que el GDNF liberado durante al menos 1 mes es bioactivo (Figura 5).

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas de este estudio son:

- Se desarrollaron con éxito micropartículas biodegradables y biocompatibles de PLGA cargadas con GDNF utilizando el TROMS para su preparación.

- Las micropartículas presentaron un tamaño adecuado para su administración en el cerebro.
- Las eficacias de encapsulación conseguidas son suficientes para la correcta dosificación de la proteína por tratarse de un factor neurotrófico activo a dosis muy pequeñas.
- El proceso de fabricación de las micropartículas no afecta a la actividad biológica del GDNF tal y como se pudo comprobar al estudiar la diferenciación morfológica de las células PC12 inducida por el factor neurotrófico encapsulado.
- Se ha obtenido un sistema que permite la liberación sostenida de GDNF bioactivo al menos durante un mes (tiempo suficiente para estudiar sus efectos en el cerebro de ratas hemiparkinsonianas).

Por todo lo citado anteriormente podemos afirmar que las micropartículas de GDNF son una prometedora estrategia para la administración de dicho factor neurotrófico en el tratamiento de la enfermedad de la EP. Próximamente se ensayarán las formulaciones seleccionadas en modelos animales de EP (ratas).

Referencias bibliográficas

1. Emborg, ME. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J. Neurosci. Meth.*, 2004; 139: 121-143.
2. Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibañez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons *in vivo*. *Neuron*, 1995 ; 15: 1465-1473.
3. Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F. Mesecephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from



- axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature*, 1995; 373: 339-41.
4. Cass WA. GDNF selectively protects dopamine neurons over serotonin neurons against the neurotoxic effects of amphetamine. *J. Neurosci.*, 1996; 16: 8132-139.
 5. Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, 1995; 373: 289-90.
 6. Tomac A, Widenfalk J, Lin LF, Kohno T, Ebendal T, Hoffer BJ, Olson L. Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal systems suggests a trophic role in the adult. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 8274-278.
 7. Bowenkamp KE, David D, Lapchak PL, Henry MA, Granholm AC, Hoffer BJ, Mahalik TJ. 6-hydroxydopamine induces the loss of the dopaminergic phenotype in substantia nigra neurons of the rat. A possible mechanism for restoration of the nigrostriatal circuit mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp. Brain Res.*, 1996; 111: 1-7.
 8. Bowenkamp KE, Lapchak PA, Hoffer BJ, Bickford PC. Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses motor impairment in 16-17 month old rats. *Neurosci. Lett.*, 1996; 211 : 81-84.
 9. Bowenkamp KE, Ujhelyi L, Cline EJ, Bickford PC. Effects of intra-striatal GDNF on motor coordination and striatal electrophysiology in aged F344 rats. *Neurobiol. Aging*, 2000; 21: 117-24.
 10. Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC. Dopamine neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science*, 1997; 277: 389-90.
 11. Choi-Lundberg DL, Lin Q, Schallert T, Crippens D, Davidson BL, Chang YN, Chiang YL, Bardwaj L, Bohn MC. Behavioral and cellular protection of rat dopaminergic neurons by an adenoviral vector encoding glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol.*, 1998; 154: 261-75.
 12. Apostolides C, Sandford E, Hong M, Mendez I. Glial cell line-derived neurotrophic factor improves intrastriatal graft survival of stored dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 1998; 83: 363-72.
 13. Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, 1996; 380: 252-55.
 14. Grondin R, Zhang Z, Yi A, Cass WA, Maswood N, Andersen AH, Elsberry DD, Klein MC, Gerhardt GA, Gash DM. Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. *Brain*, 2002; 125: 2191-201.
 15. Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*, 2000; 290: 767-73.
 16. Palfi S, Leventhal L, Chu Y, Ma SY, Emborg M, Bakay R, Deglon N, Hantraye P, Aebischer P, Kordower JH. Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 4942-954.
 17. McBride JL, Kordower JH. Neuroprotection for Parkinson's disease using viral vector-mediated delivery of GDNF. *Progr. Brain Res.*, 2002; 138: 421-32.
 18. Kordower JH. In vivo gene delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 2003; 53: S120-S132.
 19. Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nature Medicine*, 2003; 9: 589-95.
 20. Bowenkamp KE, Hoffman AF, Gerhardt GA, Henry MA, Biddle PT, Hoffer BJ, Granholm AC. Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. *J. Comp. Neurol.*, 1995; 335: 479-89.
 21. Winkler C, Sauer H, Lee CS, Bjorklund A. Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 1996; 16: 7206-215.
 22. Fox CM, Gash DM, Smoot MK, Cass WA. Neuroprotective effects of GDNF against 6-OHDA in young and aged rats. *Brain Res.*, 2001; 896: 56-63.
 23. Bowenkamp KE, Lapchak PA, Hoffer BJ, Miller PJ, Bickford PC. Intracerebroventricular glial cell line-derived neurotrophic factor improves motor function and supports nigrostriatal dopamine neurons in bilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Exp. Neurol.*, 1997; 145: 104-17.
 24. Kordower JH, Palfi S, Chen EY, Ma SY, Sendera T, Cochran EJ, Mufson EJ, Penn R, Goetz CG, Comella CD. Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 1999; 46: 419-24.



25. Grondin R, Cass WA, Zhang Z, Stanford JA, Gash DM, Gerhardt GA. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases stimulus-evoked dopamine release and motor speed in aged rhesus monkeys. *J. Neurosci.*, 2003 ; 23: 1974-980.
26. Cass WA, Manning MW, Bailey SL. Restorative effects of GDNF on striatal dopamine release in rats treated with neurotoxic doses of metamphetamine. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000; 914: 127-36.
27. Jollivet C, Aubert-Pouessel A, Clavreul A, Venier-Julienne MC, Montero-Menei CN, Benoit JP, Menei P. Long-term effect of intra-striatal glial cell line-derived neurotrophic factor-releasing microspheres in a partial rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 2004; 356: 207-10.
28. Aubert-Pouessel A, Vernier-Julienne MC, Clavreul A, Sergent M, Jollivet C, Montero-Menei CN, Garcion E, Bibby DC, Menei P, Benoit JP. In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres. *J. Control. Release*, 2004; 95: 463-75.
29. Blanco-Prieto MJ, Durieux C, Dauge V, Fattal E, Couvreur P, Roques BP. Slow delivery of the selective cholecystokinin agonist pBC 264 into the rat nucleus accumbens using microspheres. *Journal of Neurochemistry* 1996; 67 (6): 2417-24.
30. Garbayo E, Aymerich MS, Lanciego JL, Blanco Prieto MJ. Expression and Purification of GDNF for its microencapsulation in drug delivery systems and application in Parkinson's disease. *Revista Mapfre Medicina*, 2006; 17: 166-71.