

## Cambios en la densidad de receptores a benzodiazepinas y $\mu$ opioides en la sustancia nigra pars compacta y el núcleo pedunculopontino de ratas, por inyección local de 6-hidroxi-dopamina

✉ Lisette Blanco<sup>1</sup>, Luisa L Rocha<sup>2</sup>, Lourdes del C Lorigados<sup>1</sup>, Nancy Pavón<sup>1</sup>, Lysis Martínez<sup>1</sup>, Vivian Blanco<sup>3</sup>, Yovani Coro-Grave<sup>1</sup>, Leticia Neri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN)  
Ave.25 No. 15805 e/ 158 y 160, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: lisette.blanco@infomed.sld.cu

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Superior México (CINVESTAV), Unidad Sur

<sup>3</sup>Hospital Clínico Quirúrgico "10 de Octubre", Ciudad de La Habana, Cuba

### RESUMEN

Existen evidencias de las modificaciones en la actividad gabaérgica y opioide en los ganglios basales y en otras estructuras relacionadas con estos, asociadas al parkinsonismo; pero los resultados informados no son concluyentes y aún no se conocen las bases moleculares que subyacen en estos cambios. Estudiar los cambios en la densidad de receptores benzodiazepínicos (BDZ) y  $\mu$  ( $m$ ) opioides en el modelo de enfermedad de Parkinson inducido por la administración intracerebral de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), en ratas. Se organizaron tres grupos de ratas Wistar: sanas, lesionadas con 6-hidroxi-dopamina y falsas lesionadas. Un mes después de la lesión de la *substantia nigra pars compacta* (SNc) se sacrificaron todas las ratas por decapitación. Se obtuvieron cortes coronales representativos de SNc y del núcleo pedunculopontino (NPP), en los cuales se practicó la técnica de autorradiografía para receptores BDZ (con el empleo de <sup>3</sup>H-flunitrazepam) y para receptores  $\mu$  opioides (con el empleo de <sup>3</sup>H-DAMGO). Se realizó la lectura de la densidad óptica (DO) en SNc y NPP de ambos hemisferios, la cual se convirtió en fmol/mg de tejido sobre la base de los valores obtenidos en los estándares de tritio. La densidad de receptores BDZ mostró diferencias significativas, desde el punto de vista estadístico, entre los grupos experimentales. Esta variable disminuyó tanto en la SNc ( $p < 0.001$ ) como en el NPP ( $p < 0.001$ ) ipsilateral a la inyección de 6-OHDA. La densidad de receptores  $\mu$  opioides en la SNc no exhibió diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos experimentales. Esta variable mostró una disminución estadísticamente significativa en el NPP ipsilateral a la inyección de 6-OHDA ( $p < 0.01$ ). De acuerdo con los resultados, existen cambios en la densidad de receptores BDZ y  $\mu$  opioides en la SNc y el NPP asociados con la administración intracerebral de 6-OHDA. Estos cambios pudieran representar un eslabón en la cadena de eventos moleculares y neuroquímicos que caracterizan el desbalance entre las dos vías de proyección, las cuales conducen la información motora, desde la corteza motora pasando por los núcleos que conforman los ganglios basales, el tálamo y el regreso a la corteza motora en condiciones de parkinsonismo.

Palabras claves: SNc, NPP, receptores BDZ, receptores  $\mu$  opioides, 6-OHDA

Biocología Aplicada 2006;23:211-217

### ABSTRACT

**Effects of the local injection of 6-OHDA on the density of BDZ and  $\mu$  opioid receptors of the substantia nigra pars compacta and pedunculopontine nucleus of rats.** Although there is evidence suggesting a relationship between Parkinsonism and modifications to gabaergic and opioid activity in basal ganglia and related structures, the published results are not conclusive, and the molecular mechanisms underlying these changes remain unknown. This work studies the changes in population density of benzodiazepine (BDZ) and  $\mu$  ( $m$ ) opioid receptors in an animal model of Parkinsonism induced by the intracerebral administration of 6-hydroxydopamine in Wistar rats, using three experimental groups (untreated, treated with 6-OHDA, and treated with saline). One month after inducing lesions on the *substantia nigra pars compacta* (SNc) all rats were sacrificed by decapitation and frozen coronal sections of the samples, representative of the SNc and the pedunculopontine nucleus (PPN), were obtained and studied by autoradiography for BDZ receptors (using <sup>3</sup>H-flunitrazepam) or for  $\mu$  opioid receptors (using <sup>3</sup>H-DAMGO). The optical density (OD) was measured in SNc and PPN of both hemispheres, using the OD readings of the tritium standards to determine tissue radioactivity values for the accompanying tissue sections and to convert them to fmol/mg protein. The density of BDZ receptors showed statistically significant variations among the experimental groups, being down-regulated both in the SNc ( $p < 0.001$ ) and PPN ( $p < 0.001$ ), ipsilateral to the site of 6-OHDA injection. On the other hand, whereas the density of  $\mu$  opioid receptors showed statistically significant variations in the PPN ( $p < 0.01$ ), being ipsilaterally down-regulated in the animals receiving 6-OHDA injections, there was no such variation ( $p > 0.05$ ) in the SNc. The results prove that there are changes in the density of BDZ and  $\mu$  opioid receptors in the SNc and the PPN upon intracerebral administration of 6-OHDA, which may constitute one of the steps of the sequence of molecular and neurochemical events underlying the imbalance between "direct" and "indirect" pathways of basal ganglia which is typically seen in Parkinsonism. Additionally, these results underscore the importance of the mesopontine tegmentum in the pathophysiology of Parkinson's disease.

Key words: SNc, PPN, BDZ,  $\mu$  receptors, 6-OHDA

## Introducción

Los principales estudios neuroquímicos desarrollados en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson (EP), se han dirigido al sistema dopaminérgico [1, 2]. El estudio de otros sistemas de neurotransmisores, como los aminoácidos y los péptidos opioides, se ha subordinado esencialmente a diseños experimentales, que abordan el efecto de la administración de fármacos con actividad dopaminérgica sobre el funcionamiento de estos sistemas [3-6]. Además, las poblaciones de receptores dopaminérgicos se han estudiado extensamente en modelos de parkinsonismo, pero se dispone de menos información sobre los cambios en las poblaciones de otros tipos de receptores para neurotransmisores.

Los receptores GABA<sub>A</sub> forman parte de un complejo macromolecular que incluye un canal selectivo para el ión cloruro y diferentes sitios de reconocimiento, entre los que se ubica el sitio para benzodiazepinas, conocido como receptor benzodiazepínico (BDZ) [7, 8]. Como consecuencia, los fármacos benzodiazepínicos ejercen su acción al mejorar la transmisión gabaérgica, lo cual supone incrementar la frecuencia de apertura del canal de cloruro y, por tanto, disminuir la excitabilidad neuronal [7, 9, 10].

Existe un número de evidencias que apuntan hacia un aumento en la regulación del complejo GABA<sub>A</sub> / BDZ, como respuesta a una estimulación crónica de los receptores dopaminérgicos [11]. Se ha postulado que este mecanismo pudiera estar involucrado en las discinesias inducidas por L-DOPA en modelos experimentales de parkinsonismo en primates, no así en seres humanos [11]. De igual forma, se le ha atribuido a la dopamina una función moduladora de la actividad del complejo receptor GABA<sub>A</sub> / BDZ, principalmente en el *striatum* [9].

Por otra parte, en la literatura se informa de los cambios en la neurotransmisión peptidérgica en los ganglios basales, secundarios a la degeneración nigral, desde la década de los noventas [12]. Muchos de los neuropéptidos están localizados en los circuitos de los ganglios basales [13-15]. La "vía directa" del circuito motor coexpresa junto con el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), los péptidos como sustancia P y las dinorfinas; mientras que la "vía indirecta" coexpresa GABA y encefalinas [16, 17]. En relación con su distribución, los receptores opioides  $\mu$  ( $\mu$ ),  $\delta$  ( $\delta$ ) y  $\kappa$  ( $\kappa$ ) se hallan en la *substantia nigra pars compacta* (SNc), el *Globus pallidus* (GP), en el *striatum* y en la corteza [16, 18]. Al antagonista opioide (-) naloxone se le atribuye actividad antiparkinsoniana, y se destaca su empleo en el tratamiento de las discinesias inducidas por L-DOPA [19, 20]. Igualmente se ha estudiado la función neuroprotectora del (-) naloxone, el cual inhibe la producción de radicales libres del tipo del anión superóxido en la microglia, lo que pudiera atenuar los procesos neurodegenerativos [21].

En la actualidad, numerosos autores discuten sobre la participación del núcleo pedunculopontino (NPP) en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP) [22-25]. Desde el punto de vista neuroquímico el NPP se considera una estructura heterogénea [26]. Este núcleo envía una proyección colinérgica y otra presumiblemente glutamatérgica a la SNc y al núcleo subtalámico (NST) [24, 25]. De manera simultánea, el

NPP recibe aferencias dopaminérgicas de la SNc [4, 27], glutamatérgicas del NST [27-29] y gabaérgicas de las estructuras de salida de los ganglios basales, *substantia nigra pars reticulata* (SNr) y segmento interno del GP [29]. Las células pontinas expresan receptores glutamatérgicos N-methyl D-aspartato (NMDA) y  $\alpha$ -amino-3 hidroxy-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) [30], receptores colinérgicos muscarínicos y nicotínicos [31], receptores gabaérgicos GABA<sub>A</sub> [32, 33], así como receptores a diferentes neurotrofinas, como el factor de crecimiento, derivado de los fibroblastos [26].

El objetivo de esta investigación fue estudiar los cambios en la densidad de receptores  $\mu$  opioides y BDZ en el modelo de hemiparkinsonismo en ratas, por inyección intracerebral de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).

## Materiales y métodos

El estudio se realizó con ratas Wistar, machos adultos, con un peso entre 200 y 250 gramos, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. Se mantuvieron tres animales por caja durante el experimento, con ciclos de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad, y acceso libre al agua y los alimentos. El trabajo experimental se realizó teniendo en cuenta las Normas Prácticas para el uso de animales de laboratorio.

### Lesión de la SNc

Las ratas se anestesiaron con 420 mg/kg de peso de hidrato de cloral por vía intraperitoneal (i.p.), y se colocaron en un equipo de cirugía estereotáctica para roedores (David Kopf Instruments, EE.UU.). Se les inyectó 3  $\mu$ L de una solución de 6-OHDA (8  $\mu$ g/3  $\mu$ L de solución salina fisiológica al 0.9% y 0.5 mg/mL de ácido ascórbico), a razón de 1  $\mu$ L/min en la SNc derecha, utilizando las siguientes coordenadas estereotácticas, según el atlas de Paxinos y Watson [34]: AP = -4.4 mm; L = 1.2 mm; V = 7.8 mm.

Un mes después de la lesión de la SNc, se estudió la actividad rotatoria inducida por d- Anfetamina (5 mg/kg, i.p.). Esta variable se evaluó en 90 min, mediante un multicontador electrónico (LE 3806, PanLab, Barcelona, España) acoplado a sensores (LE 902, PanLab, Barcelona, España), que determinaban el sentido de giro. En el estudio se incluyeron solo los animales que mostraron no menos de siete giros por minuto, lo que corresponde a una desnervación dopaminérgica igual o superior al 90% [35, 36]. La administración de solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%), con el mismo volumen y coordenadas, permitió conformar un grupo control falso de animales lesionados.

Se organizaron tres grupos experimentales: ratas sanas (n = 9), ratas con lesión de la SNc (n = 7), ratas falsas lesionadas en la SNc (n = 5).

Al concluir el estudio de actividad rotatoria, a las ratas se les administró una dosis mayor de hidrato de cloral (480 mg/kg de peso, i.p.) para anestesarlas, y se sacrificaron por decapitación. Los cerebros se extrajeron y congelaron en hielo seco y, posteriormente, se conservaron a -80 °C hasta ser rebanados.

Para los estudios de autorradiografía, se obtuvieron series de seis cortes coronales (20  $\mu$ M) en las coordenadas correspondientes a la SNc y al NPP. La SNc comenzó a aparecer en la coordenada anteroposterior

1. Jenner P. The contribution of the MPTP-treated primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease. *Park and Rel. Disord* 2003;9:131-7.

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

3. Sonsalla PK, Albers DS, Zeevalk GD. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of Parkinsonism. *Amino Acids* 1998;14:69-74.

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

5. Calon F, Rajput AH, Hornywiecz O, Bedard PJ, Di Paolo T. Levodopa-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in PD. *Neurobiol of Disease* 2003;14:404-16.

6. Picconi B, Centonze D, Rossi S, Bernardi G, Calabresi P. Therapeutic doses of L-DOPA reverse hyperactivity of corticostriatal D-2 dopamine receptors and glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Brain* 2004;127(7):1661-9.

7. Olsen WR, DeLorey TM. GABA, Glycine. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (eds.). *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Filadelfia: Ed. Lippicott Williams & Wilkins; 1999:335.

8. Simeone TA, Donevan SD, Rho JM. Molecular biology and ontogeny of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the mammalian central nervous system. *J Child Neurol* 2003;18(1):39-48.

9. González-Hernández T, Barroso China P, Rodríguez M. Response of the gabaergic and dopaminergic mesostriatal projections to the lesion of the contralateral dopaminergic mesostriatal pathway in the rat. *Mov Disord* 2004;19(9):1029-42.

10. Ondo WG, Hunter C. Flumazenil, GABA<sub>A</sub> antagonist, may improve features of Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2003;18(6):683-5.

11. Calon F, Morissette M, Goulet M, Grondin R, Blanchet PJ, Bedard P, Di Paolo Th. Chronic D1 and D2 dopaminomimetic treatment of MPTP-denervated monkeys: effects on basal ganglia GABA<sub>A</sub>/BDZ receptor complex and GABA content. *Neurosci Int* 1999;35:81-91.

12. Fernández A, De Cejallos LM, Jenner P, Marsden CD. Neurotensin, Substance P, Delta and Mu Opioid Receptors are decreased in basal ganglia of Parkinson's Disease Patients. *Neurosci* 1994;61(1):73-9.

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

14. Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res* 1995;20:91-127.

15. Akil H, Owens C, Gutsein H, Taylot L, Curran E, Watson S. Endogenous Opioids: Overview and current issues. *Drug and Alcohol Dependence* 1998;51:127-40.

16. Graybiel AM. Neurotransmitters and Neuromodulatorin the Basal Ganglia. *TINS* 1990;13:244-54.

17. Groenewen HJ. The Basal Ganglia and Motor Control. *Neural Plasticity* 2003;10(1):107-20.

-4.3 y finalizó en la coordenada -6.8. El NPP comenzó a aparecer en la coordenada anteroposterior -7.3 y finalizó en la coordenada -8.8.

**Autorradiografía para receptores BDZ y  $\mu$  opioides**

Para receptores BDZ, se incubaron las secciones cerebrales durante 45 min a 4 °C en una solución que contenía 2.08 nM de 3H-flunitracepam (agonista exógeno para el sitio de acción de las BDZ en el complejo GABA<sub>A</sub>) en solución tampón Tris HCl 170 mM, pH 7.6, en ausencia o presencia de diazepam 1  $\mu$ M. La unión de receptores en presencia de diazepam se consideró una unión inespecífica [38].

Para receptores  $\mu$  opioides, las secciones cerebrales se prelavaron en una solución tampón Tris 50 mM, durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las láminas se incubaron durante 60 min a 25 oC en una solución que contenía 2 nM de [<sup>3</sup>H]Tyr-D-Ala-(Nme)Phe-Gly-ol] (3H-DAMGO) (agonista exógeno de los receptores  $\mu$  opioides) en solución Tris HCl 50 mM, en ausencia o presencia de naloxone (2  $\mu$ M) (antagonista competitivo de los receptores opioides). La unión a receptores en presencia de este compuesto se consideró una unión inespecífica [39].

Para ambas poblaciones de receptores, las incubaciones finalizaron con dos lavados sucesivos Tris HCl 50 mM (1 min cada uno) (pH 7.5, 4 oC). Finalmente, las láminas se enjuagaron en agua destilada durante 2 s a 4 oC y, luego, se secaron con aire frío.

**Exposición y revelado de las láminas**

Las láminas se colocaron en magazines de plomo para la autorradiografía junto con estándares de tritio, y se pusieron en contacto con una película sensible a tritio (Kodak MR-2). Los magazines se conservaron en un lugar oscuro y a temperatura ambiente. Los magazines correspondientes a receptores BDZ se conservaron en estas condiciones durante dos semanas y los correspondientes a receptores  $\mu$  opioides, durante 10 semanas. Posteriormente, se procesaron con revelador Kodak (D 11) y fijador rápido. La densidad óptica (DO) de los autorradiogramas se determinó utilizando un programa de análisis de imágenes (JAVA, Jandel Software del Análisis de Video). Las lecturas de la DO de los estándares se utilizaron para determinar los valores de la radiactividad del tejido de las láminas adyacentes. Para cada área de estudio se realizaron 10 lecturas de la DO por lo menos en 5 secciones y se obtuvo un promedio. Para las estructuras en estudio, se realizaron lecturas en ambos hemisferios. La DO se convirtió en femtomoles por miligramos tejido, con base en los valores obtenidos de los estándares de tritio.

**Análisis de los datos**

La prueba de normalidad de los datos se realizó por el método de Kolmogorov-Smirnov. La densidad de los receptores en los grupos experimentales se comparó con un análisis de varianza de clasificación simple, seguido por una prueba de Tukey en cada estructura y receptor por separado. En los grupos en los que se comparó la densidad de receptores en alguna de las estructuras en estudio, entre los hemisferios derecho e izquierdo, se aplicó una prueba t de Student. Se trabajó con un nivel de significación de 0.05.

**Resultados**

**Densidad de los receptores BDZ en la SNc**

La comparación de la densidad de los receptores BDZ entre ambos hemisferios cerebrales, reveló diferencias significativas en el grupo de ratas lesionadas en la SNc (t = 5.50, p < 0.01), con una disminución en el comportamiento de esta variable en la SNc derecha ipsilateral ante la inyección de 6-OHDA. Los restantes grupos no mostraron diferencias significativas para esta variable entre ambos hemisferios (figuras 1A y 2A).

Con respecto a los grupos experimentales, en el grupo de ratas lesionadas en la SNc se evidenció una disminución significativa en el comportamiento de estas variables (figuras 1B y 2A).

**Densidad de los receptores BDZ en el NPP**

La comparación de la densidad de los receptores BDZ entre hemisferios cerebrales mostró una disminución significativa en el NPP derecho de las ratas lesionadas en la SNc (t = 5.26, p < 0.01). Entre los hemisferios cerebrales en los restantes grupos experimentales, no se observaron diferencias significativas (figuras 1C y 2B).

La densidad de los receptores BDZ en el NPP entre grupos experimentales reveló diferencias significativas (F<sub>(2, 18)</sub> 8.54, p < 0.001). Estas diferencias se debieron a una disminución estadísticamente importante en el comportamiento de esta variable en el grupo de ratas lesionadas en la SNc, en comparación con los grupos control (figuras 1D y 2B).

**Receptores  $\mu$  opioides**

En la SNc, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p > 0.05) en la densidad de receptores  $\mu$

18. Minami M. Molecular Pharmacology of opioid receptors. Nippon Yakurigaku Zasshi 2004;123(2):95-104.

19. Henry P, Brotchie JM. Potential of Opioid Antagonists in the Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesias in PD. Drug & Aging 1996;9(3):149-58.

20. Mc Cormick SE, Stoseels J. Blockade of nigral and pallidal opioid receptors suppress vacuoss chewing movements in a rodent model of Tardive Dyskinesia. Neuroscience 2002;112(4):851-9.

21. Liu B, Hong J Sh. Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. J Pharmacol and Exp Therap 2003;304(1):1-7.

22. Erro E, Giménez-Amaya J. Pedunculopontine tegmental nucleus: Anatomy, functional considerations and physiopathological implications. An Sist Sanit Pamplona 1999;22(2):189-201.

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

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

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

26. García Rill E. The Pedunculopontine Nucleus. Prog Neurobiol 1991;36:363-89.

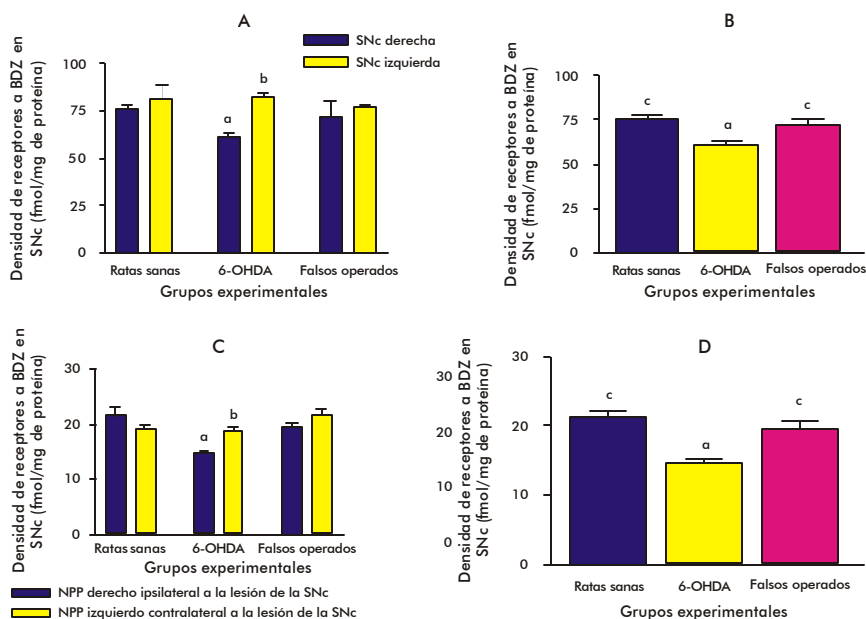


Figura. 1 Efecto de la inyección intracerebral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) sobre la densidad de receptores benzodiazepínicos en *substantia nigra pars compacta* (SNc) y núcleo pedunculo pontino (NPP). A y C) Comparación interhemisferios (prueba de t de Student); B y D) comparación intergrupos (análisis de varianza de clasificación simple y prueba de Tukey). Leyenda: Las letras desiguales sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas: a vs b (p < 0.05) y a vs c (p < 0.001).

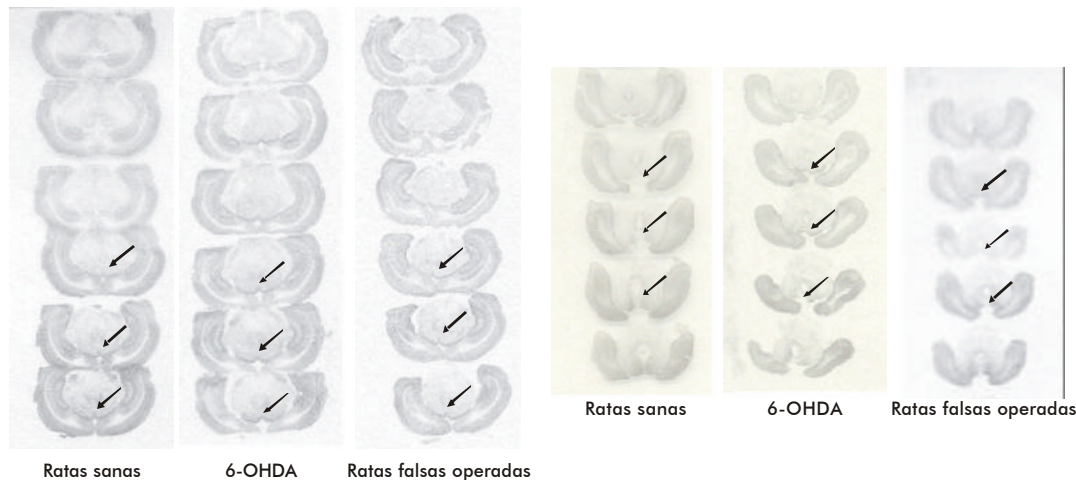


Fig. 2. Autorradiogramas de receptores BDZ en secciones coronales secuenciales de: A) *Substantia nigra pars compacta* B) Núcleo pedunculopontino de cada uno de los grupos experimentales. Leyenda: Las flechas indican la zona de lectura de la densidad óptica en el hemisferio derecho en cada una de las estructuras de interés. BDZ: receptores benzodiacepínicos.

opioides, tanto entre los hemisferios cerebrales como entre los grupos experimentales (figuras 3A y 4A).

En el NPP, el estudio comparativo de la densidad de los receptores  $\mu$  opioides entre hemisferios cerebrales, arrojó una disminución significativa de esta variable en el NPP derecho ipsilateral, ante la inyección de 6-OHDA ( $t = 3.00, p < 0.05$ ) (Figura 3B).

La comparación de esta variable entre los grupos experimentales reveló una disminución significativa en el grupo de ratas lesionadas en la SNc en comparación con los grupos control ( $F_{(2, 14)} = 6.02, p < 0.01$ ) (figuras 3C y 4B).

### Discusión

Los sistemas de neurotransmisión gabaérgico y peptidérgico se han estudiado profundamente en modelos experimentales de adicciones a psicofármacos y otras sustancias como el alcohol y los opiáceos, así como en modelos de epilepsia [20, 40-44]. El estudio de estos sistemas de neurotransmisión en modelos experimentales de parkinsonismo se ha realizado con distintas herramientas experimentales *in vitro* e *in vivo*: estudios inmunohistoquímicos [43], hibridación *in situ* para estudios de expresión de ARNm [44] y manipulación farmacológica mediante microdialísis cerebral [47], entre otras.

### Densidad de receptores BDZ

Aunque existen estudios relacionados con la actividad de los receptores gabaérgicos  $GABA_A$  y  $GABA_B$  asociados al parkinsonismo, hay muy poca información disponible, sobre los cambios en el sitio BDZ del receptor  $GABA_A$  en modelos experimentales de parkinsonismo.

En esta investigación se evidencian los cambios en las poblaciones de receptores gabaérgicos BDZ, asociados con la degeneración nigral. Estos cambios apuntan hacia una modificación sensible de la neurotransmisión gabaérgica en el modelo de 6-OHDA.

La disminución de esta variable en la SNc pudiera estar relacionada con la propia muerte de las células de la

SNc, por la acción neurotóxica de la 6-OHDA. Las células nigrales reciben una proyección gabaérgica procedente del segmento externo del GP [13, 14]. Se ha descrito que el receptor gabaérgico  $GABA_A$  es, en lo fundamental, localización post sináptica [7], por lo que la pérdida de cuerpos celulares nigrales debe afectar sensiblemente la presencia de estas poblaciones de receptores.

La disminución de la densidad de los receptores BDZ en el NPP ipsilateral a la lesión de 6-OHDA,

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

28. Bolam JP, Francis CM, Henderson Z. Cholinergic inputs to dopaminergic neurons in the substantia nigra. A double immunocytochemical study. *Neurosci* 1991;41:483-94.

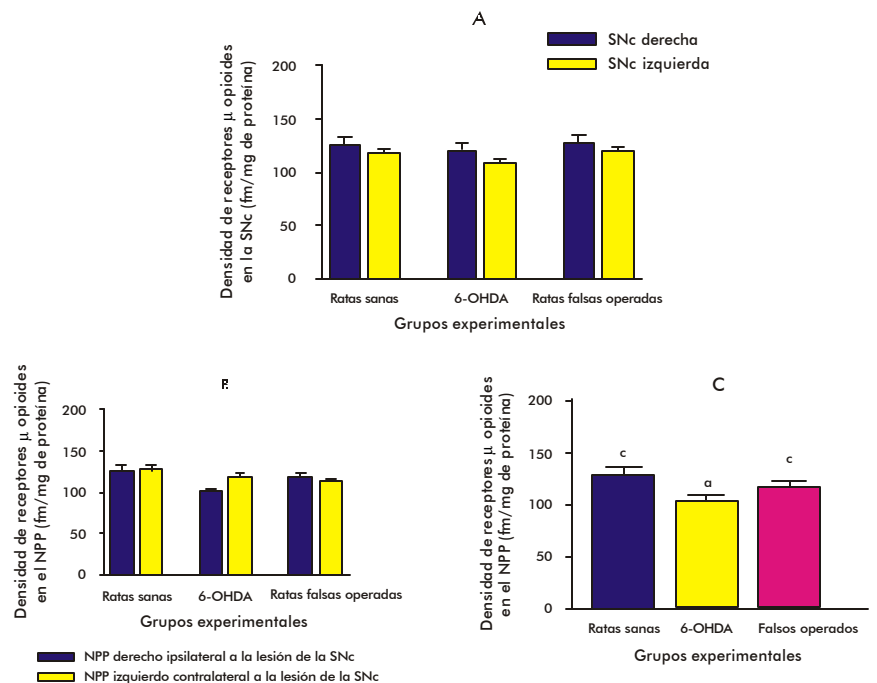


Figura 3. Efecto de la inyección intracerebral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) sobre la densidad de receptores  $\mu$  opioides en la *substantia nigra pars compacta* (SNc) y el núcleo pedunculopontino (NPP). A y B) comparación interhemisferios (prueba de t de Student); C) Comparación intergrupos (análisis de varianza de clasificación simple y prueba de Tukey). Las letras desiguales sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas: a vs b ( $p < 0.05$ ) y a vs c ( $p < 0.01$ ).



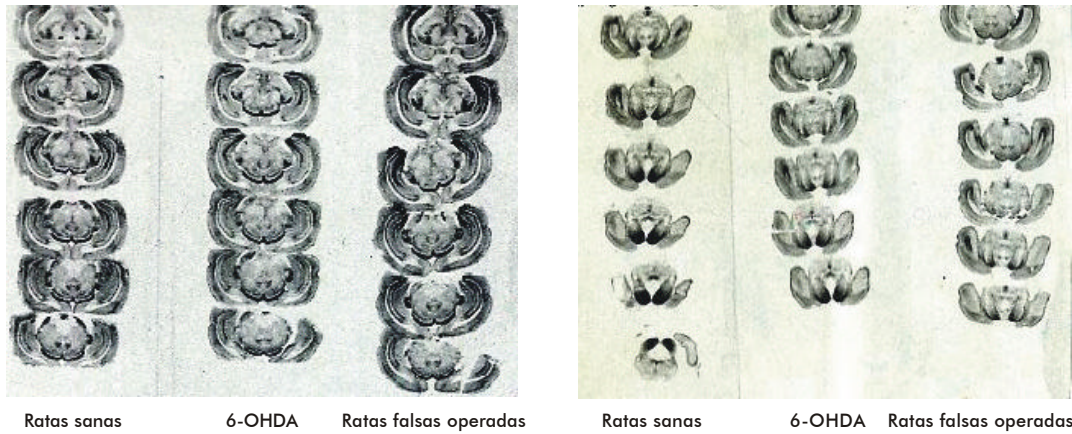


Figura 4. Autorradiogramas de receptores  $\mu$  opioides en secciones coronales de: A) *Substantia nigra pars compacta* (SNc); B) Núcleo pedunculopontino (NPP) de cada uno de los grupos experimentales. Leyenda: Los triángulos y los rombos pequeños indican la zona de lectura de la densidad óptica en cada una de las estructuras de interés.

sugiere cambios en la actividad gabaérgica en el NPP en condiciones de parkinsonismo. El NPP es una estructura anatómicamente localizada fuera de los ganglios basales, pero muy relacionada con estos mediante conexiones recíprocas con varios de sus núcleos [22]. En el NPP confluyen proyecciones de distinta naturaleza y procedencia, entre ellas, proyecciones glutamatérgicas, gabaérgicas y dopaminérgicas, procedentes del NST, SNr y/o Gpi y de la SNc, respectivamente [26-29].

De acuerdo con el modelo de funcionamiento de los ganglios basales aceptado actualmente [16, 48], existe un incremento de la actividad gabaérgica en los núcleos de salida de los ganglios basales, como resultado de la hiperactividad de la vía indirecta del circuito motor en el estatus parkinsoniano [48, 49]. Se sabe que en ratas hemiparquinsonianas existe un incremento significativo en la liberación de GABA en el NPP [49]. Además de este hallazgo, la disminución en la densidad de los receptores BDZ en el NPP ipsilateral a la lesión de 6-OHDA, refuerza la hipótesis de que se establezca un mecanismo compensatorio de ajuste al incremento de la actividad gabaérgica, lo cual sería expresión de los mecanismos de plasticidad sináptica a este nivel [50].

Otros autores han señalado que la microinyección de fármacos antagonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> como la bicuculina en el NPP, atenúa la acinesia y otros signos parkinsonianos en el modelo de parkinsonismo en primates no humanos, por la administración sistémica de 1 metil 4 fenil 1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) [51]. La bicuculina es un antagonista GABA<sub>A</sub> que disminuye la frecuencia y el tiempo medio de apertura del canal a cloruro, el cual constituye parte integral de este complejo macromolecular que es el receptor GABA<sub>A</sub> [7]. Esta droga compete con el GABA por uno o varios sitios de unión al receptor y se ha postulado que uno de estos puede ser el sitio BDZ del receptor GABA<sub>A</sub> [7].

Otros estudios tratan la función de los receptores BDZ en el *striatum*, y señalan un aumento en la densidad de estas poblaciones de receptores en el putamen de cerebros pertenecientes a pacientes parkinsonianos fallecidos [52]. Este hallazgo subra-

ya la relación entre la degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal y el estado de las poblaciones de receptores gabaérgicos [53].

Los cambios en la densidad de los receptores BDZ en el NPP representan un eslabón en la cadena de eventos moleculares y neuroquímicos que caracterizan el desbalance entre las dos vías de proyección que conducen la información motora desde la corteza – pasando por los núcleos que conforman los ganglios basales y el tálamo– y de regreso hacia la corteza motora, en condiciones de parkinsonismo.

### Densidad de receptores $\mu$ opioides

En este estudio no se encontraron modificaciones en la densidad de receptores  $\mu$  opioides en la SNc asociadas al estatus parkinsoniano. Este hallazgo pudiera explicarse por un mecanismo compensatorio presente en las células dopaminérgicas que sobreviven a la lesión neurotóxica por inyección de 6-OHDA. Estas células reciben diferentes proyecciones excitatorias que modifican su tasa de síntesis y almacenamiento de neurotransmisores, así como los estados de fosforilación de sus receptores [28, 36, 47]. Los receptores opioides, en general, presentan este tipo de actividad [15, 18], y el resultado sería una tendencia a la normalidad, similar a la observada en esta investigación.

Los resultados revelaron una discreta disminución en la densidad de receptores  $\mu$  opioides en el NPP ipsilateral ante la lesión de 6-OHDA. Ello posee especial significación si se tiene en cuenta que no se ha descrito ninguna aferencia peptidérgica que alcance el NPP, aunque se sabe que este sí posee una representación importante de receptores opioides [26].

Se conoce que las interacciones entre los péptidos opioides y sus correspondientes receptores no siempre siguen la clásica vía sináptica de liberación de una terminal presináptica y la unión a receptores en terminales post sinápticas [15, 54]. También, se ha descrito que los péptidos pueden actuar mediante vías alternativas de comunicación, como la difusión de sus moléculas hasta receptores localizados en estructuras a las que no necesariamente llega una inervación aferente de esta naturaleza [54]. Esta es

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

30. Saponiic J, Radulovacki M, Carley DW. Injection of glutamate into the pedunculopontine tegmental nuclei of anesthetized rat causes respiratory dysrhythmia and alters EEG and EMG power. *Sleep Breath* 2005;1:26-32.

31. Mamiya N, Buchaman R, Wallace T, Skinner RD, Garcia Rill E. Nicotine suppresses the P13 auditory evoked potential by acting on the pedunculopontine nucleus in the rat. *Exp Brain Res* 2005;22(3):250-60.

32. Nandi D, Stein JF, Aziz TZ. Exploration of the role of the upper brainstem in motor control. *Stereot Funct Neurosurg* 2002;78(3):158-67.

33. Pal DY, Mallick BN. GABA in pedunculopontine tegmentum regulates spontaneous rapid eye movement sleep by acting on GABA<sub>A</sub> receptors in freely moving rats. *Neurosci Lett* 2004;365(3):200-4.

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

35. Ungestend U, Herrera-Marschitz M. Behavioural pharmacology of dopamine receptor mechanisms. En: Stame L, Hedqvist P, Lagercrantz H, Wennmalm S (eds.). *Chemical neurotransmission, 75 years*. Nueva York: Ed. Academic Press 1981;481-94.

36. Zigmond M. Do Compensatory Processes Underlie the Preclinical Phase of Neurodegenerative Disease? Insights from an Animal Model of Parkinsonism. *Neurobiol Diseases* 1997;4:247-53.

37. Calon F, Di Paolo T. Levodopa responses motor complications-GABA receptors and preproenkephalin expression in human brain. *Parkinsonism and Related Disorders* 2002;8:449-54.

38. Ondarza R, Trejo-Martínez D, Corona-Amezúa R, Briones M, Rocha L. Evaluation of opioid peptide and muscarinic receptors in human epileptogenic neocortex: an autoradiography study. *Epilepsia* 2002;5: 230-4.

una de las razones por las cuales los péptidos se clasifican como neuromoduladores y no como neurotransmisores clásicos [15].

Los cambios en la densidad de los receptores  $\mu$  en el NPP, pudieran estar originados por cambios en la difusión de alguno de los péptidos endógenos, tales como las beta-endorfinas, que constituyen el mejor ligando de este tipo de receptor [55]. No obstante, teniendo en cuenta que la correspondencia ligando:receptor para los péptidos opioides no se comporta en una proporción 1:1, es posible que los cambios en la densidad de receptores  $\mu$  estén también relacionados con otros péptidos [56].

La interacción de los péptidos opioides endógenos (encefalinas, dinorfinas y b-endorfinas) con sus respectivos receptores, provoca la modulación de varias actividades intracelulares: respiración mitocondrial, actividad de canales iónicos y síntesis de mediadores de la respuesta inmune, entre otras [57, 21]. Se ha señalado que ellos, por sí mismos, no causan cambios en el potencial de membrana de la neurona post sináptica, sino que potencian la capacidad de otros neurotransmisores para alterar la excitabilidad neuronal; de ahí su función neuromoduladora [58].

La actividad peptidérgica se modifica sensiblemente en el parkinsonismo [12]. Los estudios con el empleo de ensayos de unión, han revelado marcadas diferencias regionales en el número de receptores a neuropéptidos hallados en el cerebro de pacientes

parkinsonianos fallecidos, con respecto al de personas sanas [12].

Las interacciones entre los distintos receptores, frecuentemente se establecen a partir de las moléculas responsables de la señalización intracelular, como la proteína G [59, 60]. Varios tipos y subtipos de receptores acoplados a la proteína G forman complejos heteroméricos receptor-proteína G que, a su vez, modulan la actividad de otros receptores del tipo de canales iónicos o receptores específicos para enzimas kinasas [59]. Entre los receptores opioides y los gabaérgicos ocurren las interacciones antes mencionadas, las cuales se han estudiado en modelos de epilepsia [61, 62].

Aunque buscar una posible interrelación entre los cambios en las poblaciones de receptores BDZ y los de las poblaciones de receptores  $\mu$  opioides en el NPP de ratas hemiparquinsonianas, no fue objetivo de este trabajo, resulta interesante que las modificaciones en ambos receptores se muevan hacia la disminución en la densidad de estas.

Apenas en los últimos diez años comienza a contemplarse al NPP como pieza clave en la comprensión de la fisiopatología de la EP. Los cambios en las poblaciones de receptores  $\mu$  opioides y BDZ en esta estructura en el modelo de 6-OHDA, confirman la disfunción de estos sistemas de neurotransmisión y aportan evidencias que refuerzan la importancia del tegmento mesopontino en el funcionamiento de los ganglios basales.

39. Leri F, Franklin KB. Diazepam modifies the effect of pedunculopontine lesions on morphine but not on amphetamine conditioned place preference. *Behav Brain Res* 2000;117:21-7.

40. Del Rosario-Capriles, Pacchioni AM, Cancela LM. Influence of acute or repeated restraint stress on morphine-induced locomotion: involvement of dopamine, opioid and glutamate receptors. *Behav Brain Res* 2002;134:229-38.

41. Corrigan WA, Coen KM, Zhanng J, Adamson KL. GABA mechanisms in the pedunculopontine tegmental nucleus influence particular aspects of nicotine self-administration selectively in the rat. *Psychopharmacol* 2001;158:190-7.

42. Lavolette C, Van der Koy D. GABA<sub>A</sub> receptors signal bi-directional reward transmission from the ventral tegmental area to the tegmental pedunculopontine nucleus as function of opiate state. *Europ J Neurosc* 2004;20:2179-89.

43. Rocha L. Microdialysis reveals changes in extracellular opioid peptide levels in the amygdala induced by amygdaloid kindling stimulation. *Exp Neurol* 1994;126(2):277-83.

44. Rocha L, González-Trujano E, Jiménez G, Gaona A, Ondarza R. Characterization of benzodiazepine receptor binding in immature rat brain after kainic acid administration. *Epilepsia* 2000;41(6):44-7.

45. Taylor MD, De Caballos ML, Rose S, Jenner P, Marsden D. Effects of a unilateral 6-OHDA lesion and prolonged L-3, 4-dihydroxyphenylalanine treatment on peptidergic systems in rat basal ganglia. *Europ J Pharmacol* 1992;219:183-92.

46. Granata R, Wenning GK, Jolkkonen J, Jenner P, Marsden CD. Effect of repeated administration of dopamine agonists on striatal neuropeptide mRNA expression in rats with a unilateral nigral 6-hydroxydopamine lesion. *J Neural Transmis* 1996;103:249-60.

47. Bianchi L, Galeffi F, Bolam JP, Della Corte L. The effect of 6-OHDA lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual probe analysis. *Europ J Neurosc* 2003;18:856-68.

48. De Long MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *TINS* 1990;13:281-5.

49. Blanco-Lezcano L, Rocha L, Álvarez L, Martínez-Martín L, Pavón N, González-Fraguela ME, Bauza Calderín Y, Coro Y. Efecto de la lesión de la *substantia nigra pars compacta* sobre la liberación de glutamato y GABA en el núcleo pedunculopontino. *Rev Neurol* 2005;40:23-9.

50. Viallet F, Witjas T. Neuroplasticity in Parkinson's Disease. *Rev Neurol* 2002;158(1):42-8.

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

52. Calon F, Morissette M, Rajput AH, Hornykiewicz O, Bedard PJ, Di Paolo T. Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the post mortem brain of parkinsonians with levodopa-induced motor complications. *Movt Disord* 2003;18(3):241-53.

53. Sum N, Kong L, Wang X, Holmes C, Gao Z, Zhang JR, Pfeilschifter J, Goldstein DS, Geller AI. Co-expression of tyrosine hydroxylase, GTP cyclohydrolase 1, aromatic amino acid decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 from a helper virus-free herpes simplex virus type 1 vector supports high-level, long term biochemical and behavioural correction of a rat model of Parkinson's Disease. *Hum Gene Ther* 2004;15(12):1177-96.

54. Bach -y-Rita P. Neurotransmission in the brain by diffusion through the extracellular fluid: a review. *Neuroreport* 1993;4:343-50.

55. Manis RE, Eipper BA. Peptides. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds. *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Filadelfia: Ed. Lippicott Williams & Wilkins; 1999:363.

56. Mansour A, Taylor LP, Fine JL. Key residues defining the  $\mu$  opioid receptor binding pocket: a site-directed mutagenesis study. *J. Neurochem* 1997;68:344-53.

57. Hasebe K, Kawai K, Susuki T, Kakamura K, Tanaka T, Marita M, Nagase H, Susuki T. Possible Pharmacotherapy of the Opioid  $\mu$  Receptor Agonist for Drug Dependence. *Ann NY Acad. Sci* 2004;1025:404-13.

58. Alonso-Solis R. Neurotransmisores y Neuromoduladores. En: Tresguerres JAF (eds.). *Fisiología Humana*. Madrid: Ed. Interamericana McGraw-Hill Ed 1992:63-73.

59. Agnati LF, Ferre S, Lluis C, Franco R, Fuxe K. Molecular mechanisms and Therapeutical implications of intramembrane receptor / receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA

neurons. Pharmacol Rev 2003;55(3):509-50.

steroids in PD. Neurol Sci 2003;24(3):172-3.

Brain Res 1993;612(1-2):247-52.

60. Michelle F, Longone P, Romeo E, Luchetti S, Brusa L, Pierantozzi M, Bassi A, Bernardi G, Stanzione P. Decreased plasma and cerebrospinal fluid content of neuroactive

61. Rocha L, Tatsukawa K, Chugani HT, Engel J (Jr.). Benzodiazepine receptor binding following chronic treatment with naloxone, morphine and met-enkephalin in normal rats.

62. Rocha L, Ackermann RF, Chugant HT, Engel J (Jr.). Chronic pre treatment with naloxone modifies BDZ receptor binding in amygdaloid kindled rats. Epilepsy Res 1994; 17(2):135-43.

---

*Recibido en septiembre de 2005. Aprobado en junio de 2006.*