

Efecto neuroprotector de la administración sistémica de MK-801 en el núcleo pedunculopontino de ratas hemiparkinsonizadas

✉ Lisette Blanco¹, Lourdes Lorigados¹, Lisis Martínez¹, Nancy Pavón¹, María Elena González¹, Teresa Serrano¹, Vivian Blanco²

¹Centro Internacional de Restauración Neurológica, CIREN
Ave. 25 No. 15 805 e/ 158 y 160, Playa, Ciudad de La Habana

²Centro Comunitario de Salud Mental
Calle 1^{ra} No. 19 606 e/ 10 y 12, Boyeros, Ciudad de La Habana
E-mail: lisette.blanco@infomed.sld.cu

RESUMEN

Como parte de las estrategias farmacológicas para la neuroprotección en pacientes con enfermedad de Parkinson se administraron antagonistas glutamatérgicos, ya que se conoce la hiperactividad glutamatérgica en esta afección y su consecuencia deletérea. Se evaluó el efecto de la administración sistémica de MK-801, un antagonista de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), en las concentraciones extracelulares de glutamato (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA), la pérdida de células dopaminérgicas y el proceso de muerte celular en el núcleo pedunculopontino (NPP) de ratas hemiparkinsonizadas. Se evaluaron cinco grupos de ratas Wistar: ratas con lesión de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (n = 15), lesionadas con 6-OHDA + administración sistémica de MK-801 (0.5 mg/kg de peso) (n = 17), con falsa lesión de la SNc (n = 10), lesionadas en SNc + falso tratamiento sistémico (n = 10) y ratas sanas (n = 22). Se estudió la concentración extracelular de Glu y GABA mediante microdiálisis cerebral y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección fluorimétrica, así como la pérdida de células dopaminérgicas y el proceso de muerte celular en el NPP, mediante técnicas inmunohistoquímicas para tirosina hidroxilasa y TUNEL, respectivamente. Las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP disminuyeron significativamente tras el tratamiento sistémico con MK-801, en comparación con las ratas hemiparkinsonizadas que no lo recibieron. La administración de este fármaco provocó menos pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el área tegmental ventral de las ratas tratadas, y previno el proceso de muerte celular en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas. Estos resultados sugieren un efecto neuroprotector por la disminución del tono glutamatérgico en ratas hemiparkinsonizadas tratadas sistémicamente con un antagonista de los receptores NMDA.

Palabras clave: MK-801, núcleo pedunculopontino, enfermedad de Parkinson, 6-OHDA

Biotecnología Aplicada 2009;26:53-58

ABSTRACT

Neuroprotective effects of MK-801 systemic administration on the pedunculopontine nucleus of hemiparkinsonian rats. Some glutamatergic antagonists have been administered as part of the pharmacologic strategies direct towards at neuroprotection in Parkinson's disease. It is well known the glutamatergic hyperactivity in PD and its deleterious effects in this entity. The present study focuses on the effects of MK-801 systemic administration, an N-methyl D-aspartate receptor antagonist, in the extracellular concentration of glutamate (Glu) and γ -amino butyric acid (GABA), the loss of dopaminergic cells and cell death process in the pedunculopontine nucleus (PPN) of hemiparkinsonian rats. Five groups of Wistar rats were evaluated: lesion of the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) through 6-hydroxydopamine (6-OHDA) injection (n = 15), 6-OHDA lesion + systemic administration of MK-801 (0.5 mg/kg de peso) (n = 17), falsely lesion of SNc (n = 10), 6-OHDA lesion + falsely systemic treatment (n = 10), non treated rats (n = 22). The extracellular concentration of Glu and GABA was studied by means of microdialysis cerebral and chromatography techniques, the loss of dopaminergic cells and cell death process in PPN were evaluated through immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase and TUNEL respectively. MK-801 systemic treatment induced a decrease in the Glu and GABA extracellular concentration in PPN in comparison with hemiparkinsonian rats did not receive MK-801 treatment. The administration of glutamatergic antagonist promoted a minor loss of dopaminergic cell bodies in the tegmental ventral area of the treated rats and at the same time it prevent the cell death process in the PPN from hemiparkinsonian rats. These results suggest a neuroprotector effect for the minor glutamatergic tone in hemiparkinsonian rats treated with an NMDA receptor antagonist.

Keywords: MK-801, pedunculopontine nucleus, Parkinson's disease, 6-OHDA

Introducción

Aunque la muerte de las células dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) y la consiguiente deficiencia dopaminérgica constituyen el rasgo neuropatológico distintivo de la enfermedad de Parkinson (EP), el funcionamiento de otros sistemas de neurotransmisores (como el glutamatérgico) y la actividad de otros núcleos de los ganglios basales (GB)

y fuera de estos, también se afectan [1]. La EP es un trastorno multisistémico que daña estructuras dopaminérgicas y no dopaminérgicas que degeneran las neuronas progresivamente [2].

El tratamiento actual de la EP consiste en la administración de fármacos para compensar la deficiencia dopaminérgica. La administración del aminoácido L-

1. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004; 318:121-34.

dihidroxifenilalanina (L-DOPA) es el tratamiento más efectivo [3]. Sin embargo, su uso prolongado provoca complicaciones motoras y psiquiátricas que han incentivado la búsqueda y evaluación de terapias farmacológicas alternativas, encaminadas a la neuroprotección [4]. En contraste con el tratamiento sintomático, el objetivo de esta terapia es proteger o evitar la muerte de neuronas vulnerables al proceso degenerativo [5, 6].

El glutamato (Glu) es un aminoácido excitador que activa diversos tipos de receptores localizados en los núcleos que forman los GB [7]. Como consecuencia de la pérdida de neuronas en la SNpc y de la degeneración de la vía nigroestriatal, en la EP hay una hiperactividad de las proyecciones eferentes glutamatérgicas del núcleo subtalámico (NST) hacia el *globus pallidus medialis*, la *substantia nigra pars reticulata* (SNpr), el núcleo pedunculopontino (NPP), la SNpc y el área tegmental ventral (ATV) [8]. De manera que el Glu se convierte en un tóxico endógeno, que permite la entrada masiva de calcio a la célula, y provoca reacciones dañinas para su supervivencia [8].

Algunas estrategias de administración de antagonistas glutamatérgicos que limitan la acción del Glu sobre sus receptores, o que atenúan la exposición de las células de la SNpc a la acción de este neurotransmisor por la lesión temprana del NST, evidencian un efecto neuroprotector [7-10].

Se ha demostrado que la administración sistémica previa de MK-801, antagonista de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), en la SNpc de las ratas, previene la toxicidad del ión 1-metil-4-fenil-1,2,3-piridina (MPP⁺) [11]. Otros trabajos indican que la administración conjunta de MK-801 y 1 metil 4 fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) a primates no humanos, previene la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [12].

La mayoría de los estudios sobre neurotransmisión y procesos de muerte celular en modelos experimentales de EP, se han encaminado a evaluar el funcionamiento deficiente de la SNpc por ser la degeneración de esa estructura el rasgo distintivo de esta afección [8]. Sin embargo, los cambios que ocurren en otros núcleos como el NPP, anatómica y funcionalmente muy relacionados con los GB, se han estudiado poco en la enfermedad parkinsoniana [13, 14]. El NPP está relacionado con el NST por medio de una proyección glutamatérgica y con la SNpr por una proyección gabaérgica; ambas hiperactivas en condición parkinsoniana [8, 15]. De esta forma, en el NPP convergen los impulsos excitativos e inhibidores procedentes de las dos vías del circuito motor. Por ello es importante estudiar las concentraciones extracelulares de Glu y ácido γ -aminobutírico (GABA) en este núcleo.

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la administración sistémica de MK-801 sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA y el proceso de muerte celular en el NPP junto a la pérdida de células dopaminérgicas nigrales.

Materiales y métodos

Sujetos experimentales

El estudio se efectuó con ratas Wistar, machos adultos con un peso entre 200 y 250 g, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio

(CENPALAB, La Habana, Cuba). Durante el experimento se mantuvieron tres animales por caja, con ciclos de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad y acceso libre al agua y los alimentos. Se tuvo en cuenta la *Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales de experimentación*.

Lesión de la SNpc

Con la administración intraperitoneal (i.p.) de una solución de hidrato de cloral (420 mg/kg de peso) se anestesiaron las ratas y se colocaron en un equipo de cirugía estereotáctica para roedores (Stoelting, EE.UU.). Se les inyectaron 3 μ L de una solución que contenía 8 μ g de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma, St. Louis, EE.UU.) en 3 μ L de solución salina fisiológica al 0.9% (SSF) + 0.5 mg/mL de ácido ascórbico, a razón de 1 μ L/min en la SNpc derecha, y el uso de las siguientes coordenadas estereotácticas (mm), de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson [16]: AP = -4.9, L = 1.7, DV = 8.1 (referentes a Bregma). Se administró SSF con el mismo volumen y en las mismas coordenadas para conformar un grupo control de ratas con falsa lesión.

Se conformaron los siguientes grupos: ratas con lesión de la SNpc (n = 15), ratas con lesión de la SNpc y administración sistémica de MK-801 (n = 17), ratas con falsa lesión de la SNpc (n = 10), ratas con lesión de la SNpc y administración de SSF en lugar de MK-801 (n = 10), ratas sanas (n = 22).

Actividad rotatoria

Un mes después de la inyección de 6-OHDA, se estudió la actividad rotatoria inducida por la D-anfetamina (5 mg/kg, i.p.), para comprobar la efectividad de la lesión neurotóxica. En el estudio solo se incluyeron las ratas que dieron como mínimo siete giros completos ipsilaterales a la lesión, en 1 min. Esta variable y el sentido del giro se determinaron en 90 min mediante un Multicontador Electrónico LE 3806, acoplado a los sensores LE 902 (PanLAB, Barcelona, España).

Esquema de administración sistémica de MK-801

Las ratas recibieron tres inyecciones i.p. de MK-801 (Sigma, St. Louis, EE.UU.) (0.5 mg/kg de peso) en tres días consecutivos (1 dosis/día); la tercera dosis, antes de la cirugía para inyectar la solución de la 6-OHDA. Este esquema de administración se repitió en tres días consecutivos, a partir de los 14 y de los 21 días de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA. El MK-801 se disolvió en SSF al 0.9%.

Las ratas del grupo control recibieron igual volumen de SSF con el mismo esquema de administración de MK-801.

Microdiálisis in vivo

La cánula guía se colocó en las coordenadas (mm) correspondientes al NPP derecho (AP = -8.00, L = 2.00, DV = 5.40 (referentes a Bregma), a las dos semanas de concluidos los estudios conductuales. Los experimentos de microdiálisis cerebral se realizaron 24 h después del implante de la cánula guía.

La rata se acopló a un sistema de bomba de infusión de microdiálisis cerebral (CMA 100, CMA Microdialysis, Estocolmo, Suecia) y las cánulas se infundieron

2. Muller T, Funchs G, Hahne M, Klein W, Schawarz M. Diagnostic aspects of early Parkinson's disease. *J Neurol* 2006; 253(Suppl 4):29-31.

3. Singh N, Pillay V, Choona YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2007;81:29-44.

4. Van Laar T. Parkinson's disease-related Pharmacotherapy. In: Wolters EC, Van Laar T, Berendse HW (eds.). *Parkinsonism and related disorders*. Amsterdam: Ed. VU University Express 2007;219-25.

5. López-Lozano JJ, Álvarez-Santullano M. Antiglutamatergicos, anticolinérgicos y terapias neuroprotectoras en la enfermedad de Parkinson. En: Tolosa ES, Obeso JA, Grandas FJ (eds.). *Tratado sobre la enfermedad de Parkinson*. 3ra. Edición. Madrid: Ed. Grupo Bristol-Myers Squibb 2004;385-412.

6. Levi MS, Brimble MA. A review of neuroprotection agents. *Curr Med Chem* 2004;11(18):2383-97.

7. Alonso-Solis R. Neurotransmisores y neuromoduladores. In: Tresguerres JAF (ed.). *Fisiología humana*. Madrid: Ed. Interamericana McGraw-Hill 1992;63-73.

8. Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's Disease. *TINS* 2000; 23(10):3-18.

9. Blandini F, Greenamyre JT, Fancellu R, Nappi G. Blockade of subthalamic glutamatergic activity corrects changes in neuronal metabolism and motor behavior in rats with nigrostriatal lesions. *Neurosci* 2001;22:49-50.

10. Youdim MBH, Geldenhuys WJ, Van der Schyf J. Why should we use multifunctional neuroprotective and neurorestorative drugs for Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13:S281-S291.

11. Turski L, Bressler K, Retting KJ, Lochsman P, Watchel H. Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by NMDA antagonist. *Nature* 1991;349:414-8.

12. Zuddas A, Oberto G, Vaglini F, Fascetti F, Formai F, Corsini G. MK-801 prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *J Neurochem* 1992;59:733-9.

13. 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.

14. Hamani C, Stone S, Laxton A, Lozano M. The pedunculopontine nucleus and movement disorders: Anatomy and the role for deep brain stimulation. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13:S276-S280.

15. Jenkinson N, Nandi D, Muthusamy K, Gregory R, Stein J, Aziz T. Anatomy, physiology and pathophysiology of the pedunculopontine nucleus. *Mov Disord* 2009; 24(3):319-28.

16. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, NY. 1998.

continuamente con una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa): NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, NaH₂PO₄ 0.5 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, MgCl₂·6H₂O 1 mM, CaCl₂ 1.2 mM, ácido ascórbico 1.2 mM, pH 7.4 -7.6 a un flujo de 2 µL/min.

Los experimentos se hicieron con las ratas despierdas, de acuerdo a los pasos descritos [17].

Evaluación bioquímica. Cuantificación de los aminoácidos

Las concentraciones de aminoácidos en los dializados se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acoplada a un detector de fluorescencia, y se usó derivatización con o-ftaldialdehído (OPA). Cada muestra se analizó por duplicado. Esta técnica se ejecutó de acuerdo con lo descrito en la literatura [17].

Evaluación de la pérdida de células dopaminérgicas

Al concluir los estudios *in vivo*, las ratas recibieron una dosis mayor de hidrato de cloral (i.p.; 480 mg/kg) y se perfundieron a través de la aorta ascendente con 500 mL de NaCl 0.9% y 500 mL de una solución fijadora (paraformaldehído 4% / glutaraldehído 0.1% / ácido pícrico 15% en fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4). A continuación se extrajeron los cerebros, se conservaron en la solución fijadora durante 1 h, se lavaron con fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, se crioprotegieron en sacarosa al 7, 15 y 30% (24 h en cada concentración) y se congelaron en nitrógeno líquido. Seguidamente se obtuvieron cortes coronales (20 µm) de la SNpc. Las secciones se montaron en láminas portaobjetos previamente recubiertas con gelatina-alumbre de cromo. El procesamiento inmunohistoquímico para la visualización de las células inmunorreactivas a la enzima tirosina hidroxilasa (TH) se realizó de acuerdo con lo descrito anteriormente [18].

Método de detección de muerte celular *in situ* (TUNEL)

La fragmentación del ADN se detectó *in situ* mediante un equipo que contiene deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), según la descripción del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). Para esta técnica se siguieron los pasos descritos en la literatura [17].

Con el objetivo de verificar si existía muerte apoptótica, se contrastaron las secciones con reactivo de Hoechst 33258 pentahidratado (bis-benzimidida) FluoroPure (Molecular Probes, EE.UU.) 20 ng/mL diluido en amortiguador fosfato durante 2 min y finalmente se cubrieron con medio de montaje Vectashield. Las láminas se examinaron en un microscopio de fluorescencia (λ excitación 560-500 nm y λ detección 515-565 nm; Leitz, Alemania).

Análisis de los datos

En todos los casos se determinó la normalidad de los datos por medio de la prueba de Kolmogorov Smirnov. Igualmente se probó la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. La comparación de las concentraciones de Glu y GABA entre los grupos experimentales se realizó mediante un análisis de varianzas (ANOVA) de clasificación simple, seguido por una

prueba de Tukey. Se trabajó con un nivel de significación de 0.05. Para el análisis de los datos se empleó el software *Statistica CSS* versión 6.1.

Resultados

Concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP

La comparación de las concentraciones extracelulares de Glu en el NPP reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F_{(4,39)} = 6.57$; $p < 0.05$). El grupo de ratas hemiparkinsonizadas que no recibió tratamiento farmacológico mostró los mayores niveles de Glu extracelular. Las ratas tratadas sistémicamente con MK-801 tuvieron un comportamiento intermedio y significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las ratas con lesión de la SNpc sin tratamiento farmacológico y las ratas control (Figura 1A).

La comparación de las concentraciones extracelulares de GABA evidenció diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F_{(4,37)} = 4.13$; $p < 0.05$). El grupo de ratas hemiparkinsonizadas que no recibió tratamiento farmacológico mostró los mayores valores de esta variable. Las ratas que recibieron tratamiento sistémico con MK-801 mostraron una reducción significativa de las concentraciones extracelulares de GABA, estadísticamente similar a las concentraciones en las ratas sanas y las ratas con falsa lesión de la SNpc (Figura 1B).

Presencia de células dopaminérgicas en la SNc de ratas hemiparkinsonizadas

La presencia de cuerpos celulares positivos a la enzima TH en el ATV de las ratas que recibieron administración sistémica de MK-801 demuestra una menor pérdida de células dopaminérgicas en esta zona, en comparación con las ratas lesionadas en la SNpc que no recibieron tratamiento farmacológico (Figuras 2A y B). No obstante, el tratamiento farmacológico falló al no evitar la pérdida de células dopaminérgicas en la SNc.

Estudio de fragmentación del ADN celular en el NPP

El estudio de la fragmentación del ADN celular (TUNEL) mostró células TUNEL+ en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron tratamiento farmacológico (Figura 3). En contraposición, en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas tratadas con MK-801 se observó escasamente inmunopositivo a TUNEL, lo que sugiere que el tratamiento con este fármaco previene el desarrollo de procesos de muerte celular en el NPP ipsilateral a la inyección de 6-OHDA (Figura 3).

Discusión

Consideraciones sobre el esquema de administración de MK-801 empleado

Los resultados indican que el esquema de administración sistémica de MK-801 seguido en este trabajo modifica el cuadro de parkinsonismo inducido por la inyección intracerebral de 6-OHDA, lo que concuerda con otros autores [19, 20]. En general, las ratas hemiparkinsonizadas tratadas con MK-801 presentan menos pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el

17. Blanco L, Lorigados L, Orozco S, Luisa LL, Pavón N, González ME, et al. Aumento de las concentraciones extracelulares de aminoácidos neurotransmisores y muerte celular en el núcleo pedunculopontino de ratas hemiparkinsonizadas por inyección de intracerebral de 6-hidroxi dopamina. *Biotechnol Apl* 2007;24:33-40.

18. Blanco L, Lorigados L, García R, Martínez L, Pavón N, González ME, et al. Efecto neuroprotector de la administración sistémica de (-) nicotina en ratas hemiparkinsonizadas. *Biotechnol Apl* 2008;25:126-34.

19. Campbell BM, Kreipke CW, Walker PD. Failure of MK-801 to suppress D1 receptor-mediated induction of locomotor activity and striatal preprotachylinin mRNA expression in the dopamine-depleted rat. *Neurosci* 2006;137:505-17.

20. Allers KA, Bergstrom DA, Ghazi LJ, Kreiss DS, Walters JR. MK-801 and amantadine exert different effects on subthalamic neuronal activity in a rodent model of Parkinson's Disease. *Exp Neurol* 2005;191:104-18.

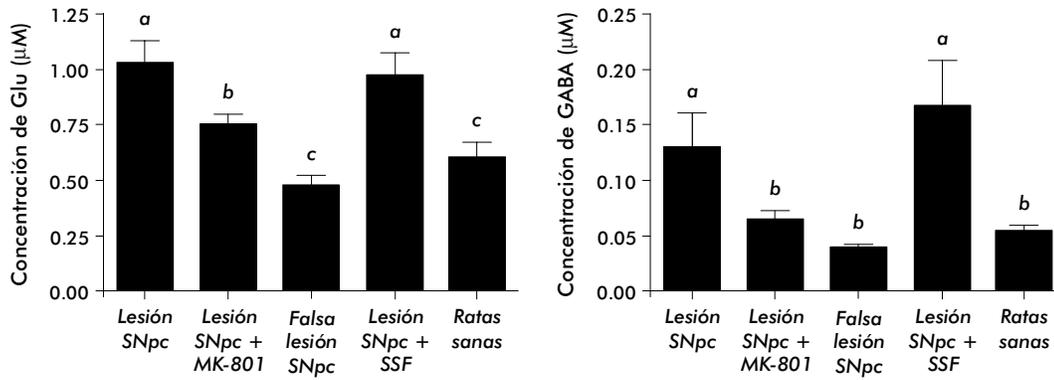


Figura 1. Efecto del tratamiento sistémico con MK-801 (0.5 mg/kg de peso intraperitoneal) en las concentraciones extracelulares de glutamato (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA) en el núcleo pedunculopontino. A. Comparación de la concentración de Glu entre los grupos ($F(4, 39) = 6.57$; $p < 0.05$) a frente a b; $p < 0.05$; b frente a c; $p < 0.01$; a frente a c; $p < 0.001$. B. Comparación de la concentración de GABA entre los grupos ($F(4, 37) = 4.13$ $p < 0.05$) a frente a b; $p < 0.01$. Grupos experimentales: ratas con lesión de la substantia nigra compacta (SNc) (n = 9), ratas con lesión de la SNc + MK-801 (n = 17), ratas con falsa lesión de la SNc (n = 6), ratas con lesión de la SNc + solución salina fisiológica (SSF) (n = 6), ratas sanas (n = 10). ANOVA de clasificación simple y prueba de Tukey. (Las barras representan valores \pm error estándar de la media).

ATV, menos concentraciones extracelulares de Glu y GABA y menos incidencia de procesos de muerte celular en el NPP.

Este esquema de administración responde a dos efectos del MK-801 descritos en la literatura: el incremento de la expresión estriatal de dinorfinas [19], y la modificación de la frecuencia de descarga de las neuronas glutamatérgicas subtalámicas [20].

La administración de MK-801 previa a la inyección de 6-OHDA obedece al efecto de este fármaco y potencia la expresión génica estriatal de las dinorfinas en las neuronas que dan origen a la *vía directa* del circuito motor [19]. Este efecto pudiera prevenir la disminución en la transmisión estriatonigral que se instala tempranamente en el modelo de 6-OHDA [19, 21]. No obstante, se ha descrito que el efecto neurotóxico de la 6-OHDA sobre las células nigrales sigue un curso que dura aproximadamente 4 semanas, al término de las cuales se establece de forma irreversible la asimetría motora que caracteriza al modelo [21]. Durante este tiempo, ocurre un incremento gradual de la actividad glutamatérgica; y se ha descrito que específicamente a los quince días, ocurre el pico de actividad glutamatérgica de origen subtalámico, que antecede a la aparición de los síntomas parkinsonianos [22, 23]. La segunda y tercera administración de MK-801 en este estudio se realiza para bloquear la hiperactividad glutamatérgica en un período crítico de activación subtalámica [24].

Efecto de la administración de MK-801 sobre la pérdida de células dopaminérgicas

Los resultados de este estudio sugieren que con el tratamiento con MK-801 se consigue un efecto protector del daño neurotóxico de los cuerpos celulares dopaminérgicos en la zona del ATV. El ATV forma parte del sistema dopaminérgico mesolímbocortical y proyecta al núcleo *accumbens* [25]. La literatura ha argumentado que la inyección de la neurotoxina 6-OHDA en las coordenadas correspondientes a la SNpc afecta la supervivencia de las células dopaminérgicas del ATV [26], a diferencia de su administración en el *striatum* (St) o en la vía nigroestriatal, que causa un transporte retrógrado

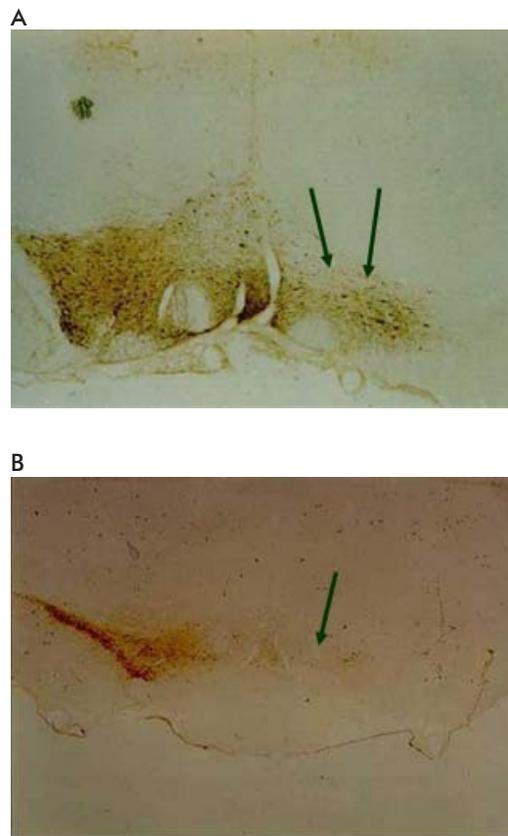


Figura 2. Microfotografía de la inmunodetección de la enzima tirosina hidroxilasa en una sección coronal a nivel del área tegmental ventral (ATV) y la substantia nigra pars compacta (SNpc). A. Rata con lesión de la SNc y tratamiento con MK-801 (10X). B. Rata con lesión de la SNpc sin tratamiento con MK-801 (5X). Las flechas indican la presencia de cuerpos celulares dopaminérgicos en la zona correspondiente al ATV en la figura. Lo que contrasta con la ausencia de estos en la figura B.

de esta sustancia con la muerte selectiva de las células dopaminérgicas de la SNpc y la conservación de las

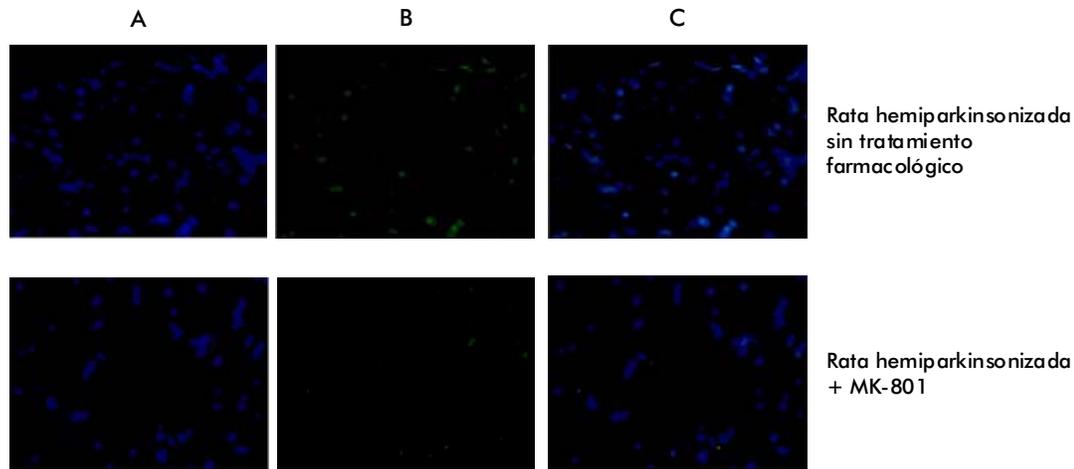


Figura 3. Microfotografía representativa de la inmunodetección de células TUNEL+ en secciones coronales del núcleo pedunculopontino (NPP) contrastadas con reactivo de Hoescht 33258 (RH) ($n = 5$). A) Tinción con RH en un campo. B) Igual campo que A pero con el marcador TUNEL. Nótese la escasa inmunopositividad a TUNEL+ en las ratas hemiparkinsonizadas tratadas con MK-801. C) Doble expresión de la tinción con RH y el marcaje con TUNEL, se observan en color azul brillante las células teñidas y marcadas (40x).

células del ATV [27].

La administración de antagonistas glutamatérgicos revierte, al menos, algunas de las cascadas de cambios neuroquímicos que se desencadenan en los GB posterior a la denervación dopaminérgica [28]. A su vez, la expresión de receptores NMDA en las células del ATV es mayor que en las células de la SNpc, y esta diferencia pudiera constituir el sustrato morfofisiológico del efecto neuroprotector del MK-801 sobre estas células [29].

La menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el ATV de las ratas tratadas con MK-801 puede tener una repercusión importante en el mantenimiento, al menos parcialmente, del St bajo control dopaminérgico [28]. Ello puede atenuar el remodelamiento de las sinapsis en el St ipsilateral a la lesión, y luego disminuir la asimetría motora de las ratas hemiparkinsonizadas [30, 31].

Concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP

La reducción de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas tratadas con MK-801 e inyectadas con 6-OHDA puede estar relacionada con el efecto del tratamiento farmacológico al atenuar la actividad glutamatérgica corticoestriatal y corregir el desbalance de otros neurotransmisores como la dopamina.

La vía dopaminérgica nigral y las terminales glutamatérgicas corticales convergen en las neuronas de proyección estriatal y dan lugar a una interacción muy fina entre estas sinapsis [32, 33]. Durante la afección parkinsoniana ocurre un desbalance en la neurotransmisión estriatal con un incremento de la transmisión glutamatérgica corticoestriatal [32, 34]. Ambos efectos convergen en el incremento de la descarga de potenciales de acción de las células estriatales cuando estas se despolarizan por la descarga de la terminal presináptica corticoestriatal [35].

Los estudios morfológicos demuestran que la denervación dopaminérgica causa cambios estructurales en el St, como el remodelamiento de sus espinas

dendríticas, que interfieren con los mecanismos de plasticidad sináptica corticoestriatal [36, 37]. La administración sistémica de antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA tiene múltiples efectos sobre el funcionamiento de los núcleos que forman los GB [38]. Sin embargo, no hay referencias que describan el efecto de la administración sistémica de MK-801 en el modelo de 6-OHDA sobre la neurotransmisión mediada por Glu y GABA en el NPP, de modo que los resultados de este estudio son un aporte al conocimiento en este campo.

Recientemente se publicó un estudio sobre una reducción en la tasa de descarga y un cambio en el patrón de actividad eléctrica de las células glutamatérgicas del NST de ratas hemiparkinsonizadas bajo el efecto de la administración sistémica de MK-801 [22].

La administración local de MK-801 en el St tiene efectos diferentes en dependencia de la localización de las inyecciones intraestriatales y la distribución topográfica también diferencial de los receptores de NMDA en el territorio estriatal [38]. La perfusión de MK-801 en las neuronas de proyección que forman la vía ST-GPI, puede tener efectos parkinsonizantes por la desinhibición de este circuito. En contraposición, la inyección de MK-801 en las neuronas que dan origen a la vía St-SNpr, provoca marcados efectos antiparkinsonianos [38].

La literatura señala que el exceso de inhibición gabaérgica que recibe el NPP en condición parkinsoniana puede explicar en parte la hipocinesia típica de esta entidad a partir de las proyecciones de este núcleo hacia la red de interneuronas de la médula espinal a través del haz reticuloespinal [39].

A partir de nuestros hallazgos, pensamos que la administración sistémica de MK-801 empleada en este estudio pudiera corregir algunos de los efectos de la denervación dopaminérgica sobre la neurotransmisión excitativa corticoestriatal. Ello redundaría en un menor desbalance entre las vías del circuito motor de los GB. La disminución de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, en el que confluyen ambas

21. Robinson TE, Mocsary Z, Camp DM, Whishaw IQ. Time course of recovery of extracellular dopamine following partial damage to the nigrostriatal dopamine system. *J Neurosci* 1994;14(5):2687-96.

22. Bezard E, Boraud T, Bioulac B, Gross C. Involvement of the subthalamic nucleus in glutamatergic compensatory mechanisms. *Eur J Neurosci* 1999;11:2167-70.

23. Vila M, Périer C, Féger J, Yelnik J, Faucheux B, Ruberg M, et al. Evolution of changes in neuronal activity in the subthalamic nucleus of rats with unilateral lesion of the substantia nigra assessed by metabolic and electrophysiological measurements. *Eur J Neurosci* 2000;12:337-44.

24. Koutsilieri E, Riederer P. Excitotoxicity and new antilglutamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13:S329-31.

25. Björklund A, Lindvall O. Dopamine-containing system in the CNS. In: Björklund A, Hökfelt T (eds.). *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 2: Classical Transmitter in the CNS. Amsterdam: Ed. Elsevier 1984;55-122.

26. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid A, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;65:135-72.

27. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Cell Tissue Res* 2004;318:215-24.

28. Vila M, Marin C, Ruberg M, Jiménez A, Raisman-Vozari R, Agid Y, et al. Systemic administration of NMDA and AMPA receptor antagonist reverses the neurochemical changes induced by nigrostriatal denervation in basal ganglia. *J Neurochem* 1999;73:344-52.

vías del circuito motor, puede ser una expresión funcional de esta corrección.

Muerte celular en el NPP

Algunos autores señalan la pérdida de aproximadamente el 40 al 50% de las células colinérgicas del NPP en la EP [40]. Otros han señalado la ausencia de procesos de muerte celular en las neuronas colinérgicas del NPP en modelos experimentales de EP, tanto en roedores como en primates no humanos [41]. Estos últimos hallazgos sugieren que tales neuronas son menos vulnerables a los procesos de excitotoxicidad desencadenados por la activación glutamatérgica subtalámica, que las células dopaminérgicas de la SNpc [38]. Sin embargo, el NPP contiene diversas poblaciones neuronales, neuroquímicamente diferentes. Además de la presencia de neuronas colinérgicas, se han detectado neuronas glutamatérgicas, gabaérgicas y peptidérgicas en el NPP de las ratas [14, 42].

Estudios previos en nuestro laboratorio, demostraron la presencia de un proceso de muerte celular en el NPP ipsilateral a la inyección de 6-OHDA [18]. En condición parkinsoniana las poblaciones neuronales que conforman el NPP, están expuestas a un incremento de la actividad glutamatérgica de origen subtalámico junto con la disminución de la influencia dopaminérgica nigroponatina [43]. Este desbalance puede estar asociado a la promoción de eventos disparadores de mecanismos de muerte celular en alguna de tales poblaciones neuronales.

Los resultados de nuestro trabajo sugieren que el tratamiento sistémico con MK-801 previene el proceso de muerte celular en el NPP. Este hallazgo acentúa la importancia de las estrategias terapéuticas que intentan atenuar la hiperactividad glutamatérgica sobre los núcleos que reciben proyecciones de esta

naturaleza procedentes del NST. La literatura señala que la administración de MK-801 puede prevenir la muerte celular mediante dos mecanismos fundamentales: el bloqueo directo del receptor glutamatérgico de NMDA y la inhibición del factor de necrosis tumoral alfa, el cual potencia la toxicidad del glutamato e inhibe los mecanismos de recaptura de este neurotransmisor [10].

El estudio del efecto del bloqueo sistémico de la transmisión glutamatérgica en el proceso de muerte celular en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas, es especialmente importante, ya que este ejerce un control sobre los movimientos voluntarios de varias partes del cuerpo, en estrecha asociación con otros núcleos del cerebro [14]. Otros estudios han insistido en la participación de las neuronas glutamatérgicas pontinas en la iniciación de los movimientos programados, mientras que la actividad de las neuronas colinérgicas está vinculada al mantenimiento de un patrón de marcha estable y uniforme [44, 45].

Un estudio reciente señaló una reducción del 36% de las neuronas colinérgicas y del 27% de las neuronas no colinérgicas del NPP en el cerebro de pacientes parkinsonianos [46]. Los datos mostraron una correlación negativa altamente significativa con los registros de la escala de Hoehn y Yahr que evalúan los síntomas axiales de la enfermedad, los trastornos del equilibrio y de la marcha. Esto significa que mientras más severa es la discapacidad del paciente parkinsoniano, más acentuado es el perfil de muerte celular en el NPP [46].

La muerte de células del NPP puede potenciar la disfunción de esta estructura en condición parkinsoniana y ser parte del sustrato morfofisiológico de los trastornos motores que presentan las ratas hemiparkinsonizadas tras la inyección intracerebral de 6-OHDA.

29. Mathé J, Nomikos G, Hygge K, Svensson T. Differential actions of dizocilpine (MK-801) on the mesolimbic and mesocortical dopamine system: role of neuronal activity. *Neuropharmacology* 1999;38:121-8.

30. Zigmond MJ, Stricker EM. Parkinson's disease: studies with an animal model. *Life Sci* 1984;35:5-18.

31. Metz GA, Whishaw IQ. Drug-Induced Rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. *Neurosci* 2002; 111(2):325-36.

32. Calabresi P, Centonze D, Bernardi G. Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *TINS* 2000; 23(10):557-60.

33. Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neurosci* 1998; 86(2):353-87.

34. Deutch AY. Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2006;70:67-70.

35. Groenewen HJ. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast* 2003;10(1-2): 107-20.

36. Deutch AY, Colbran RJ, Winder DJ. Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13:S251-8.

37. Chase Th, Justin D. Striatal dopamine- and glutamate- mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *TINS* 2000; 23(10):86-90.

38. Nash JE, Brotchie JM. Characterization of striatal NMDA receptors involved in the generation of parkinsonian symptoms: intrastriatal microinjection studies in the 6-OHDA-lesioned rats. *Mov Disord* 2002;17:455-66.

39. Stein J. Akinesia, motor oscillations and the pedunculopontine nucleus in rats and men. *Exp Neurol* 2009;215:1-4.

40. Hirsch EC, Graybiel AM, Duyckaerts C, Javoy-Agid F. Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5976-80.

41. Heise CE, Teo ZCh, Wallace BA, Ashkan K, Benabid AL, Mitrofanis J. Cell survival patterns in the pedunculopontine tegmental nucleus of MPTP monkeys and 6-OHDA-lesioned rats: evidence for differences to idiopathic Parkinson's disease patients? *Anat Embryol* 2005; 210:287-302.

42. García-Rill E. The pedunculopontine nucleus. *Prog Neurobiol* 1991;36:363-89.

43. Schulz JB. Mechanisms of neurodegeneration in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13:S306-8.

44. García-Rill E. The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res* 1996;11:4763.

45. Bhidayasiri R, Gasser H, Cohen SN, Tourettelote WW. Midbrain ataxia: possible role of the pedunculopontine nucleus in human locomotion. *Cerebrovasc Dis* 2002;234:1-6.

46. Rinne JO, Yong Ma S, Sik M, Collan Y, Røytta M. Loss of cholinergic neurons in the pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease is related to disability of the patients. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14(7):553-7.

Recibido en octubre de 2008. Aprobado en marzo de 2009.