

Artículo premiado en las Jornadas de la Sociedad Bioquímica de Cuyo



Ventajas de un modelo animal de hemiparkinsonismo para el estudio de nuevas moléculas neuroactivas con potenciales aplicaciones terapéuticas

 15 min.



La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente. Resulta de una degeneración primaria de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. El conocimiento parcial de los fenómenos celulares y moleculares que gatillan la EP, su diagnóstico tardío y la falta de una terapéutica efectiva que detenga o retrase la evolución de la misma, son las principales razones que motivaron a numerosos grupos de investigación a desarrollar modelos experimentales de EP en animales. Este artículo hace mención al modelo de neurodegeneración inducido por el neurotóxico 6-OHDA, por ser el más utilizado para el desarrollo de modelos animales de parkinsonismo y hemipar-

kinsonismo.



Casas, S (1); Garcia, S (1,2); Cabrera, R (1); Yunes, R (1,2)

1. INBIOMED-IMBECU-CONICET. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Mendoza
2. Área de Farmacología, FCM, Universidad Nacional de Cuyo



E-mail: casas_sebastian@hotmail.com



El presente artículo resulta de la generosa oferta de la revista "Bioanálisis" a la Sociedad de Biología de Cuyo, en cuya reunión anual 2010 la presentación del trabajo "Efectos neuromodulatorios de

progesterona sobre signos premotores en un modelo animal de enfermedad de Parkinson" fue galardonado con el primer premio en la Sección de Farmacología.

Resumen

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente. Resulta de una degeneración primaria de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. A pesar de los adelantos científicos y tecnológicos, la terapéutica actual existente para esta enfermedad, es sólo sintomática. Uno de los principales obstáculos en el desarrollo de una terapia neuroprotectora es el conocimiento limitado de los eventos celulares y moleculares que desencadenan dicha patología. La necesidad de contar con un modelo animal fiable y representativo de la enfermedad ha llevado a numerosos grupos de investigación a desarrollar

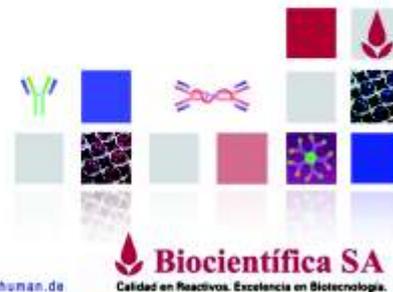
IMEC

Human
Diagnostics Worldwide

Ahora todas las soluciones en el mismo lugar.
La línea más completa en reactivos para autoinmunidad.

Reactivos para autoinmunidad de última generación para:

- Anticuerpos Anti Fosfolípidos
- Celiaquía y Gastroenterología
- Enfermedades Reumáticas
- Inmunocomplejos y Sistema Complemento
- Hepatopatías Autoinmunes
- Vasculitis y Nefrología
- Cardiología
- Trastornos de la Coagulación
- Enfermedades Tiroideas
- Andrología, Ginecología y Fertilidad
- Artritis reactivas
- Equipamientos para Automatización de Laboratorios de ELISA



moléculas con comportamiento neurotóxico selectivo, tales como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y recientemente, paraquato y rotenona. En este artículo sólo se hará mención al modelo de neurodegeneración inducido por el neurotóxico 6-OHDA, por ser el más utilizado para el desarrollo de modelos animales de parkinsonismo y hemiparkinsonismo.

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP), descrita por James Parkinson en el año 1817, afecta a más del 1% de la población por encima de los 55 años y es ligeramente más frecuente en el varón que en la mujer (7). Su prevalencia aumenta con la edad, siendo del 3,1% en sujetos entre 75 y 84 años (11). Constituye el trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. Fisiopatológicamente, resulta de una

degeneración primaria de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN) (Figura 1). La causa de la enfermedad se desconoce (8). Sus manifestaciones clínicas cardinales, que permiten el diagnóstico médico, surgen de manera tardía, cuando la muerte neuronal es del 80% (5). Es decir, el conocimiento parcial de los fenómenos celulares y moleculares que gatillan la EP, su diagnóstico tardío y la falta de una terapéutica efectiva que detenga o retrase la evolución de misma, son las principales razones que motivaron a numerosos grupos de investigación a desarrollar modelos experimentales de EP en animales.

Modelos experimentales

Las condiciones para un modelo animal ideal de EP deben mimetizar la pérdida neuronal dopaminérgica y los déficit comportamentales (motores y no-motores) asociados a su presentación en humanos. Desde el punto de vista experimental, existen numerosos modelos

de parkinsonismo. Los más recientes son modelos animales genéticamente modificados mediante técnicas de sustracción génica (knockout), incorporación génica (knockin) o reducción en la expresión génica (knockdown) en la secuencia del ADN nuclear, los cuales han permitido un gran avance en la comprensión de la fisiopatología de dicha patología. Los modelos más utilizados se basan en el uso de toxinas, las cuales se acumulan selectivamente en las neuronas dopaminérgicas de la SN, causando disfunción celular y finalmente la muerte celular. El mayor avance de estos modelos surgió con la introducción de la neurotoxina catecolaminérgica 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Otras neurotoxinas son la MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) y los insecticidas paraquato y rotenona. En este artículo sólo se hará mención al modelo de neurodegeneración inducida por el neurotóxico 6-OHDA, por ser el más ampliamente utilizado en el desarrollo de modelos experimentales de parkinsonismo

Analizadores para la medición de pH, gases en sangre, electrolitos, SO_2 , Hb y glucosa.

OPTI® R / OPTI® CCA-TS / OPTI® LION

 **OPTIMedical**
www.optimedical.com

OPTI® R Analizador de gases en sangre con cassettes reusables.

OPTI® CCA-TS Analizador portátil de gases en sangre.

OPTI® LION Analizador de electrolitos.



OPTI® R



OPTI® CCA-TS

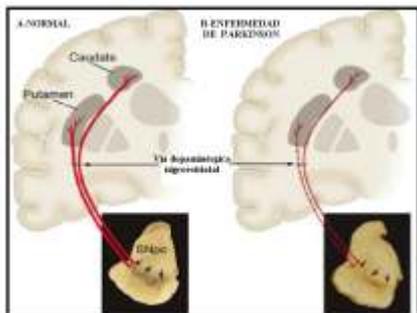


OPTI® LION

y hemiparkinsonismo en roedores, gatos y monos (4).



Figura 1: Degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal por muerte neuronal de la sustancia negra para compacta (SNpc).



Neuron, Vol.39, 889-909, September 11,2003, Parkinson's Disease: Mechanisms and Models.

Como se mencionó al comienzo del

artículo, la EP se caracteriza fisiopatológicamente por una degeneración lenta, progresiva e irreversible de la vía dopaminérgica nigroestriatal. Ésta, en cerebro de rata, tiene su origen en el grupo celular A9, localizado en la SN pars compacta (SNpc). Los axones de estas neuronas corren a lo largo del mesencéfalo y terminan en el cuerpo estriado (CE) dorsal. Este núcleo, a su vez, se encuentra constituido por el núcleo caudado y putámen.

Ungerstedt en 1968 describió por primera vez que la inyección del neurotóxico 6-OHDA en cerebro de ratas, mediante cirugía estereotáxica, inducía una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) de SN (Figura 2). Por el contrario, cuando se administraba por vía sistémica destruía sólo las neuronas adrenérgicas de los ganglios simpáticos careciendo de acción tóxica sobre el sistema nervioso central. Existen tres sitios anatómicos posibles de

inyección del neurotóxico. Estos son: a) SN; b) mesencéfalo o c) CE. Las principales diferencias en la elección de alguno de estos sitios son: a) complejidad de la cirugía; b) cantidad de neuronas DA degeneradas y; c) tiempo de evolución de la enfermedad. Tal es así, que la inyección de 6-OHDA en SN involucra una cirugía compleja e induce una degeneración estática, rápida y completa de las neuronas DA (5), mientras que si se la administra en mesencéfalo o CE, la complejidad de la cirugía es menor y produce una neurodegeneración lenta y progresiva.

Se habla de hemiparkinsonismo cuando se lesiona sólo una de las vías dopaminérgicas nigroestriatales, usualmente la del hemisferio cerebral izquierdo, dejando la vía nigroestriatal contralateral indemne. Caso contrario, se denomina parkinsonismo, cuando se lesionan ambas vías. La mayor cantidad de publicaciones científicas, de los últimos años, utilizan el

Soluciones rápidas y sencillas para problemas críticos: Ahora es posible

Sistema portátil de alta tecnología,
método inmunofluorométrico

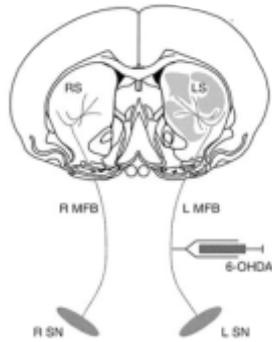


- Triage BNP:** Para detección de Péptido natriurético tipo B.
- Triage D Dimer:** Para la detección de Dímero D.
- Triage Cardiac Panel:** Troponina I, CK-MB y Mioglobina.
- Triage Cardio Profiler:** Troponina I, CK-MB, Mioglobina y BNP.
- Triage SOB:** Troponina I, CK-MB, Mioglobina, BNP y Dímero D.

modelo de hemiparkinsonismo, inducido por 6-OHDA e inyectado en CE (4g/2l) (1,9).



Figura 2: Diagrama de la vía dopaminérgica (DA) nigroestriatal. Áreas grises en cuerpo estriado izquierdo indican pérdida de terminales DA por inyección de 6-OHDA sobre eferencias nigroestriatales.



La selectividad y especificidad del neurotóxico es debida a su alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas. Es decir, ésta molécula es transportada dentro de las terminales presinápticas y posteriormente hacia el soma celular de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. La neurotoxicidad de 6-OHDA está basada en la formación de especies reactivas de oxígenos (SRO) como anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH) y quinonas producto de su metabolización (5). Finalmente comprometen e inhiben los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial, ocasionando déficit de ATP y muerte neuronal. Así, sustancias antioxidantes como vitamina E o N-acetil-cisteína, inhibidores de la MAO y quelantes de hierro como desferoxamina ejercen un efecto neuroprotector frente a la acción neurotóxica de la 6-OHDA.

Para prevenir la recaptación del neurotóxico por las neuronas noradrenérgicas, los animales son pretratados con desipramina 25 mg/kg intraperitoneal, 45 minutos previos a la cirugía.

Desde el punto de vista conductual, este modelo, presenta inmediatamente después de la cirugía y de forma

espontánea una conducta rotatoria ipsilateral a la lesión que se mantiene durante las 24 horas siguientes. Este comportamiento es debido al desequilibrio que existe en el contenido de dopamina entre el estriado homolateral y contralateral inyectado con el neurotóxico (4). Esta actividad asimétrica, la cual representa una de las grandes ventajas del modelo de hemiparkinsonismo, es interpretada como un signo motor que manifiesta la enfermedad. Esto es de gran relevancia, debido a que sólo el 40% de lo animales mimetizan la enfermedad (5) mientras que el 60% restante deben ser descartados. Este comportamiento es evaluado a través de una prueba denominada test rotacional inducido farmacológicamente. A partir de las 2 semanas pos inyección del neurotóxico, los animales que desarrollan degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal presentan una rotación ipsilateral a la lesión cuando se les administran sustancias que aumentan la liberación de dopamina, como amfetamina (9). Mientras que a partir de la 4ª semana pos lesión, estos mismos animales muestran una rotación contralateral al lado de la lesión cuando reciben agonistas dopaminérgicos como apomorfina (Figura 3) (2,6) Esto es debido al incremento del número de receptores dopaminérgicos que existe en el estriado homolateral a la lesión como consecuencia de la denervación. Por el contrario, la amfetamina, al incrementar la liberación de dopamina en las terminales presinápticas incrementa la concentración de este neurotransmisor únicamente en el estriado contralateral a la lesión, produciéndose un desequilibrio funcional a favor del estriado no lesionado. En la evaluación de este comportamiento rotatorio se utiliza un aparato denominado "rattun". El mismo consiste en un recipiente plástico, apoyado sobre una base giratoria y conectado a un programa informático específico mediante un brazo mecánico (10). De esta manera, el animal es colocado dentro del bowls plástico, previamente inyectado con la droga correspondiente al tiempo de evolución de su enfermedad (2 semanas, amfetamina o 4 semanas, apomorfina) y se lo evalúa durante 90 minutos (Figura 4). Un animal sano (control) tiende a rotar de

manera similar hacia ambos lados. Diferente es lo que ocurre en un animal hemiparkinsoniano, por lesión de la vía dopaminérgica nigroestriatal izquierda, que rota ipsilateralmente (izquierda), a las 2 semanas pos lesión, y contralateralmente (derecha), a partir de las 4 semanas pos lesión (Figura 5) (9). Esta actividad rotatoria asimétrica es utilizada como parámetro de evaluación de los potenciales efectos neuroprotectores de nuevas moléculas experimentales. Es decir, muchos investigadores buscan el retraso de la aparición de esta contralateralidad tras el tratamiento, con estas nuevas drogas, de los animales lesionados.



Figura 3: Inducción farmacológica del comportamiento rotatorio ipsilateral y contralateral a la vía dopaminérgica nigroestriatal lesionada.

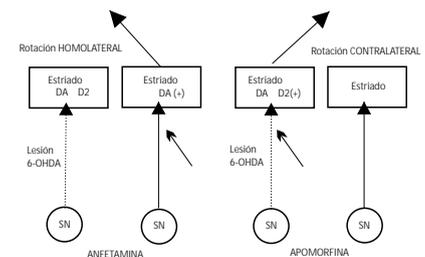


Figura 4: Rattun, instrumento para evaluar comportamiento rotatorio asimétrico inducido farmacológicamente.



Figura 5: Prueba totacional inducida



MINDRAY

Más que analizadores...

la solución a sus necesidades.

BC-2800

Analizador Hematológico Automático.

Diferencial de 3 poblaciones,
19 parámetros
+ 3 histogramas (RBC, WBC, PLT).
Velocidad: 30 muestras por hora.
Bajo costo de insumos.



BC-3000Plus

Analizador Hematológico Automático.

Diferencial de 3 poblaciones,
19 parámetros, + 3 histogramas (RBC, WBC, PLT).
Velocidad: 60 muestras por hora.
Bajo costo de insumos.



BC-5500

Analizador Hematológico Automático.

Diferencial de 5 poblaciones, 27 parámetros,
2 histogramas + 2 diagramas de dispersión.
Tecnología láser combinado con método
de tinción química, Citometría de Flujo.
Velocidad: 80 muestras por hora.
2 modos de medición: manual con tubo
abierto o cerrado y automático con Auto Sampler.
Capacidad de identificación de células anormales.
Lector de códigos de barras incorporado.
Gran pantalla de LCD sensible al tacto.



BS-200

Autoanalizador de Química Clínica.

200 Test por hora (sin ISE).
40 posiciones para reactivos
en compartimiento refrigerado.
40 posiciones para muestras.
Interface bi-direccional a
software de laboratorio.
Ideal para pequeños y
medianos laboratorios.



BS-300

Autoanalizador de Química Clínica.

300 Test por hora (sin ISE).
50 posiciones para reactivos
en compartimiento refrigerado.
60 posiciones para muestras.
Interface bi-direccional a
software de laboratorio.
Lector interno de código de
barras para muestras.



Representante exclusivo en Argentina

GEMATEC S.R.L.

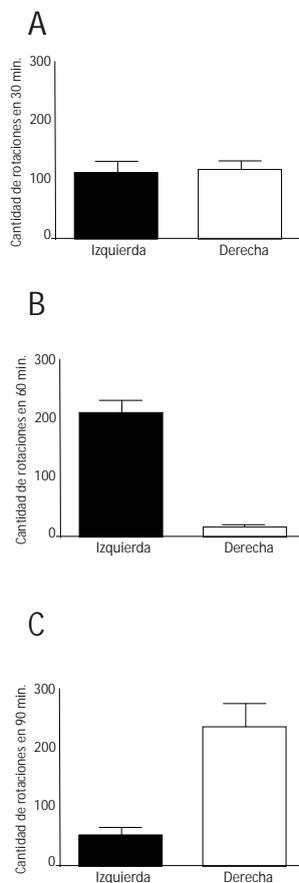
Ricardo Gutiérrez 1357 PB A, (1636) Olivos, Buenos Aires, Argentina.
Tel/Fax: (011) 4794-7575/7676/3184/1289 - 4799-3551
E-mail: info@gematec.com.ar

GEMATEC

equipamiento para medicina 

www.gematec.com.ar

farmacológicamente, evaluados durante 90 minutos. A- Animales controles (sanos). B y C- Animales hemiparkinsonianos por degeneración de la vía dopaminérgica izquierda. Comportamiento rotatorio ipsilateral (izquierda) inducido por anfetamina y comportamiento rotatorio contralateral (derecha) inducido por apomorfina respectivamente.



Nuestros resultados, reportados en numerosas publicaciones y congresos internacionales, revelan que la administración de progesterona (PROG) 4 mg/kg s.c., 3 dosis, 7 días posteriores a la inyección del neurotóxico, retrasa la aparición de los signos motores (contralateralidad) y no motores (déficit de memoria y trastorno de la afectividad) de neurodegeneración; como así también presenta un efecto modulador positivo a largo plazo sobre las terminales dopaminérgicas nigroestriatales (3).

Importancia de este modelo de hemiparkinsonismo

Concluimos que algunas de las ventajas de trabajar con un modelo de hemiparkinsonismo inducido por 6-OHDA son: 1) permite demostrar, a través de la prueba rotacional inducida farmacológicamente, que los animales con los que se experimenta se encuentran verdaderamente lesionados, 2) observar los cambios neuronales plásticos compensatorios, en la vía DA nigroestriatal contralateral al lado lesionado y 3) utilizar al mismo animal como sujeto enfermo (vía DA lesionada) y como sujeto control (vía DA indemne) siendo más representativos los potenciales efectos neuroprotectores de las nuevas drogas.

De esta manera, utilizando este modelo experimental, muchos investigadores se proponen los siguientes objetivos: 1) caracterizar ciertos signos no motores al inicio de la enfermedad, 2) estudiar eventos celulares y moleculares que gatillan la patología, 3) evaluar nuevas moléculas biológicas con potenciales acciones neuroprotectoras.

Agradecimientos

Agradecemos al Sr. Roitman, dueño de la Farmacia Sevilla, por su colaboración en la donación de desipramina. Este trabajo ha sido en parte financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET, PIP 5942), de RC y RY, por la Universidad Nacional de Cuyo (SECTYP, 06/J288) de RY y por la Universidad de Mendoza (113/07) de RC y RY.

Bibliografía

1. Blandini, F; et al. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism and Related disorders*. 2008. 14:124-129
2. Cabrera, R; et al. Turnover rate and stimulus evoke release of dopamine by progesterone and N-methyl-D-aspartic acid in rat striatum during pregnancy. *European Journal of Pharmacology*. 1996. 317:55-59.
3. Casas, S; et al. Progesterone prevents

depression-like behavior in a model of Parkinson's disease induced by 6-OHDA in male rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. ENVIADO para revisión 26-07 del 2010. Manuscript number assigned Ms. N° PBB-D-10-00285.

4. Dauer, W; et al. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003. 39:889-909.

5. Deumens, R; et al. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA: Lesions of the Nigrostriatal Pathway. *Experimental Neurology*. 2002. 175:303-317.

6. Estrella, C; et al. Differential responses in central dopaminergic activity induced by apomorphine in IPL nude rat. *Behavioral Brain Research*. 2002. 133:143-148.

7. Hayes, M; et al. Current concepts in the management of Parkinson's disease. *Med J*. 2010. 192:144-149.

8. Langston, J; et al. Etiology of Parkinson's disease. In: Olanow CW, Lieberman AN, eds. *The scientific basis for the treatment of Parkinson's disease*. Park Ridge, NJ: Parthenon. 1992. 33-58.

9. Larramendy, C; et al. Cabergoline and pramipexole fail to modify already established dyskinesias in an animal model of parkinsonism. *Behavioral Brain Research*. 2008. 194:44-51.

10. Ottoni, E. 2000. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*. 2000. 32:446-449.

11. Tanner, C; et al. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*. 1992. 10:317-329.

