

# “Evaluación de la administración intracerebral de rotenona como modelo experimental de enfermedad de Parkinson”

Bach. Camila Mouhape  
Licenciatura en Bioquímica

Tutora: Dra. Giselle Prunell

Departamento de Neuroquímica

**Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

Montevideo, Uruguay

Octubre, 2012

## Índice

I. Resumen-----	5
II. Introducción: -----	6
Enfermedad de Parkinson-----	6
Dopamina-----	8
III. Causas, factores de riesgo y patofisiología de la EP-----	8
Causas y factores de riesgo de la EP-----	8
Patofisiología de la EP-----	9
IV. Tratamientos de la EP-----	12
V. Modelos de EP experimentales:-----	14
Modelos con neurotoxinas: -----	14
Modelos de EP con MPTP-----	14
Modelos de EP con 6-OHDA-----	15
Modelos de EP con rotenona-----	15
Modelos genéticos-----	16
VI. Antecedentes particulares del Laboratorio-----	16
VII. Hipótesis-----	17
VIII. Objetivo general-----	17
IX. Objetivos específicos-----	17
X. Materiales y Métodos:-----	18
Animales y grupos experimentales-----	18
Inyección intracerebral de rotenona-----	18
Evaluación morfológica: Inmunohistoquímica-----	19
Cuantificación de los niveles tisulares de DA-----	22
Determinación de los niveles de la enzima TH-----	23
XI. Resultados-----	26
1) Curva rot: niveles de DA -----	26
2) Modelo: inyección de 12ug de rot SNpc-----	27
2.1) Niveles de DA-----	27
2.2) Niveles de enzima TH -----	28
2.3) Número de células TH-positivas en SNpc-----	28

3) Curva dosis-respuesta, 30 días post-lesión-----	32
4) Modelo: inyección en HMCA de 1 y 0,5ug de rot-----	32
4.1) Número de células TH-positivas 8 días post-lesión-----	33
4.2) Número de células TH-positivas 30 días post-lesión-----	36
5) Inmunohistoquímica $\alpha$ -sinucleína-----	38
5.1) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína-----	38
5.2) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína-fosforilad-----	39
XII) Discusión-----	40
XIII) Conclusiones-----	44
XIII) Perspectivas-----	45
XV) Referencias-----	46

## Siglas

ACh: Acetilcolina

ADNm: ADN mitocondrial

CE: Cuerpo Estriado

CL: Cuerpo de Lewy

COMT: Catecol-O-Metiltransferasa

DA: Dopamina

DAT: Transportador de dopamina

DMSO: dimetil sulfoxido

EP: Enfermedad de Parkinson

ERO: Especies Reactivas del Oxígeno

GB: Ganglios Basales

HMCA: Haz medial del cerebro anterior

HPLC-ED: High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection

MAO: Monoamina oxidasa

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

MPP+: 1-metil-4-fenilpyridinium

PBS: Buffer fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

PGL: propilenglicol

rot: Rotenona

SD: desvío estándar

SDS: sodio dodecil sulfato

SNpc: Sustancia Nigra pars compacta

SOD: Superóxido dismutasa

SUP: Sistema ubiquitin-proteosomal

TH: Tiroxina Hidroxilasa

VAL: Vía Autofágica/ Lisosomal

VTA: Área Tegmental Ventral

WB: Western Blotting

$\alpha$ -sin:  $\alpha$ -sinucleína

6OHDA: 6-hidroxydopamina

## I. Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa que afecta un 2 % de la población mundial mayor de 60 años. Se caracteriza por alteraciones motoras debidas a un deterioro extrapiramidal asociado a la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc) y agregados proteicos intracelulares ricos en la proteína  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) llamados cuerpos de Lewy. Estas neuronas proyectan sus axones rostralmente vía el haz medial del cerebro anterior (HMCA) hacia el Cuerpo Estriado (CE), donde existe en la enfermedad una disminución concomitante de dopamina (DA). Los tratamientos disponibles son sintomáticos y no detienen el proceso neurodegenerativo. Por esto es fundamental la comprensión de las bases neurobiológicas de la enfermedad para el desarrollo de terapias efectivas. En este sentido, modelos preclínicos adecuados son fundamentales. En el presente trabajo se caracterizaron dos modelos experimentales de EP en ratas, donde en ambos se indujo la muerte de las neuronas dopaminérgicas inyectando la toxina rotenona (rot). En el primer modelo se inyectaron 12ug de rot unilateralmente en la SNpc y se evaluó el tejido 8 y 30 días post-lesión. La evaluación a los 8 días mostró un 40% de DA y un 74% de Tirosina Hidroxilasa (TH) (enzima limitante de la síntesis de DA) remanente en el CE del lado lesionado con respecto al lado no lesionado, mientras que el número de neuronas dopaminérgicas remanentes en la SNpc del lado lesionado fue del 9,6% con respecto al lado no lesionado a los 8 días y 1% a los 30 días. Los tejidos lesionados en los tiempos evaluados, evidenciaron un daño inespecífico de similar dimensión. Estos resultados sugieren que la inyección de rot directamente en la SNpc causa una muerte celular rápida e inespecífica en el lugar de administración de la toxina, por lo que no parece un modelo apropiado para estudiar mecanismos neuroprotectores. Sin embargo, la discordancia entre el número de neuronas dopaminérgicas y los niveles de DA y TH a los 8 días, parecen evidenciar un efecto de

compensación en las células remanentes. La relativa preservación del metabolismo dopaminérgico a nivel del CE sugiere que este modelo podría ser adecuado para estudiar fenómenos plásticos compensatorios a nivel de los terminales dopaminérgicos.

En el segundo modelo se inyectó 1ug de rot unilateralmente en el HMCA. Luego de 8 días se obtuvo del lado lesionado un 30% de muerte de neuronas TH-positivas con respecto al lado no lesionado, que progresó a un 60% a los 30 días post-lesión, no asociada a deterioro del tejido en general. Estos resultados indican que en este modelo existe una progresión relativamente lenta en la muerte neuronal, aparentemente sin generar daño en los tejidos adyacentes. A su vez, la SNpc lesionada parecerían tener mayor señal de la proteína  $\alpha$ -sin que se co-localiza con las células TH-positivas. Estos resultados sugieren que el modelo de inyección de rot en el HMCA mimetiza mejor la enfermedad y por esto sería apropiado para estudiar posibles terapias neuroprotectoras.

## II. Introducción

### Enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común luego de la Enfermedad de Alzheimer, afectando a más de 6 millones de personas en el mundo. Los síntomas característicos son escasez de movimientos espontáneos, bradiquinesia, aumento del tono muscular (rigidez), temblor en reposo y trastornos posturales (20).

Estas deficiencias motoras se deben a un deterioro extrapiramidal asociado a la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc). Estas neuronas proyectan sus axones rostralmente vía el haz medial del cerebro anterior (HMCA)<sup>1</sup> hacia el Cuerpo Estriado (CE), donde existe en la enfermedad una disminución concomitante de dopamina (DA), (vía nigro-estriatal) (Fig. 1) (26 y 50).

Aparte de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, otras características prominentes de la EP incluyen gliosis y la presencia de agregados proteicos llamados cuerpos de Lewy (CL) en dichas neuronas (11). Los CL se caracterizan principalmente por la acumulación anormal de filamentos proteicos de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) (18).

---

<sup>1</sup> HMCA equivalente a MFB (medial forebrain bundle) del inglés.

Las neuronas dopaminérgicas no son la única población de células afectada. La degeneración en otras áreas como locus coeruleus, núcleo dorsal del rafe, núcleo basal de Meynert y neuronas simpáticas post-ganglionares, podrían contribuir con muchos de los síntomas no motores de la EP, como la depresión, demencia y disfunción autonómica (24).

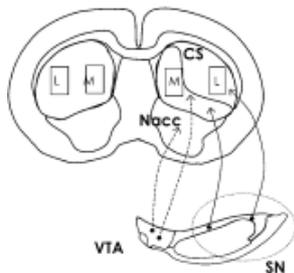


Figura 1: Esquema de una sección coronal de cerebro de rata mostrando el Cuerpo Estriado (del latín corpus striatum: CS) y el Núcleo accumbens (Nacc), donde se ilustra la inervación desde la Sustancia Nigra (SN) y el Área Tegmental Ventral (del inglés ventral tegmental area: VTA). L y M representan las áreas del cuerpo estriado lateral (L) y el medial (M).

La vía nigro-estriatal tiene una función regulatoria crucial en el circuito motor de los Ganglios Basales (GB) ya que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc modulan la salida de las neuronas espinosas del CE (Fig. 2) (33 y 42).

En condiciones normales la inervación dopaminérgica disminuye las eferencias inhibitorias de los GB aumentando la salida excitatoria del tálamo hacia la corteza motora, facilitando la selección de actos motores específicos.

Cuando las neuronas dopaminérgicas degeneran como ocurre en la EP, la eferencia inhibitoria de los GB es anormalmente alta y por lo tanto es menos probable que se desarrolle la activación talámica en la corteza motora. Los trastornos hipocinéticos en EP son un síntoma que refleja la falta de desinhibición que normalmente está mediada por los GB (31, 42, 33 y 28).

Los síntomas motores comienzan en una etapa tardía de la degeneración nigro-estriatal, cuando un 50-80% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc han degenerado (5 y 48).



Figura 2: Circuitos básicos de las vías de los GB en humanos; (+) y (-) indican conexiones excitadoras e inhibitorias. En verde se muestra la aferencia moduladora de la SNpc sobre el Núcleo caudado y putamen (equivalentes al CE en roedores) (33).

## Dopamina

La DA es una catecolamina por presentar un grupo catecol en su estructura. La síntesis de DA en las neuronas dopaminérgicas requiere de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH), que en presencia de hierro y tetrahydropteridina, oxida la tirosina a 3,4-dihidroxy-L-fenilalanina (L-DOPA), siendo éste el paso limitante seguido de la descarboxilación para formar DA (Fig. 3).



Figura 3: Esquema de la ruta biosintética de la DA. THB4: tetrahydropteridin, O2: oxígeno, Fe2+: Hierro ferroso

La acción de la DA termina a través de la re-captación pre-sináptica de las terminales dopaminérgicas por los transportadores de DA (DAT), alguna de esta DA es incorporada en vesículas, o es metabolizada por la monoamina oxidasa (MAO) o la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Existen cinco subtipos de receptores dopaminérgicos, que se sub-dividen cada uno en dos grupos según sus diferencias en especificidad para drogas y mecanismos de señales. Receptores tipo D1 estimulan la actividad de la adenil ciclasa, mientras que receptores tipo D2

inhiben esta enzima. Todos los subtipos de receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (41 y 16).

### III) Causas, factores de riesgo y patofisiología de la EP

#### Causas y factores de riesgo de la EP

Actualmente se desconoce la etiología de la enfermedad. El principal factor de riesgo de EP es la edad: afecta a 2% de la población mundial mayor de 60 años. Aproximadamente un 10% de los casos de EP se asocian a formas familiares de la enfermedad causadas por mutaciones de genes individuales como por ejemplo genes que codifican las proteínas  $\alpha$ -sin y parkina. Sin embargo, la mayoría de los casos son idiopáticos (31). Se piensa que los casos esporádicos de EP son causados por una combinación de susceptibilidad genética asociada a estímulos ambientales. De hecho, factores ambientales como por ejemplo: pesticidas, toxinas, metales, etc., han sido identificados como factores de riesgo de la enfermedad y se cree que juegan un papel preponderante en su desarrollo (7 y 50).

Una de las preguntas más recurrentes en la literatura de EP es porqué las células dopaminérgicas de la SNpc degeneran en esta enfermedad. Diferentes estudios han señalado aspectos celulares y moleculares de estas células que las hacen altamente vulnerables. Por ejemplo estas células están expuestas a altos niveles de estrés oxidativo, debido al metabolismo dopaminérgico, la relativa deficiencia de factores neuroprotectores endógenos como el antioxidante glutatión y a un aumento en la deposición de hierro (24).

#### Patofisiología de la EP

En la EP, como en otras enfermedades neurodegenerativas, varios mecanismos patogénicos han sido implicados como posibles disparadores o contribuyentes al daño celular observado. Entre otros, ellos incluyen 1) la acumulación de proteínas anormales principalmente  $\alpha$ -sin, 2) alteración de la degradación proteica, 3) disfunción mitocondrial y 4) estrés oxidativo (25 y 42). A continuación se describen cada uno de estos mecanismos.

##### **1) Acumulación anormal de proteínas, particularmente la $\alpha$ -sin.**

Una característica prominente de la EP es la presencia de agregados proteicos llamados Cuerpos de Lewy (CL) en las neuronas dopaminérgicas remanentes (11). Los CL se caracterizan

principalmente por la acumulación anormal de filamentos proteicos, siendo la  $\alpha$ -sin el principal componente. La función de  $\alpha$ -sin en condiciones fisiológicas no se conoce, pero se cree que podría estar relacionada con la regulación de la plasticidad sináptica, la neurotransmisión dopaminérgica, el tráfico del retículo endoplásmico, aparato de Golgi, así como actuar como proteína chaperona. La  $\alpha$ -sin está muy estrechamente asociada con membranas estructurales por ejemplo en las vesículas sinápticas y a varios lípidos. Como ya se mencionó, mutaciones en esta proteína causan formas autosómicas dominantes de EP. La sobre-expresión de  $\alpha$ -sin produce la muerte celular en varios sistemas experimentales, causando apoptosis y un aumento de la vulnerabilidad de las células a la toxicidad, siendo las células catecolaminérgicas las más sensibles (57). Especies oligoméricas de  $\alpha$ -sin pueden formarse bajo severas condiciones que están asociadas con EP. Estos oligómeros terminan en protofibrillas que permanecen siendo solubles al igual que las especies monoméricas. Las protofibrillas pueden luego convertirse en fibrillas tipo amiloide, las cuales son insolubles y es la forma asociada a los CL. Varios estudios evidencian que la forma oligomérica soluble de la  $\alpha$ -sin es la especie más tóxica. Existen modificaciones covalentes en la  $\alpha$ -sin que han sido observadas en EP, como la nitración en residuos de tirosina y fosforilación en la Ser/129, que bloquean la conversión de oligómeros en fibrillas (53, 55 y 43). Por otro lado la degeneración de las neuronas de la SNpc puede ocurrir en ausencia de CL. De hecho, evidencias experimentales in vitro sugieren que la formación de CLs podría ser una respuesta protectora, con el propósito de secuestrar y agregar especies de  $\alpha$ -sin dañinas (24). CLs tienen varias características en común con los agregosomas, agregados proteicos que eliminan proteínas mal plegadas. Por otro lado se ha visto que la DA puede conjugarse a  $\alpha$ -sin, formando un complejo resistente a la degradación y que es capaz de bloquear la degradación de otras proteínas, resultando en una acumulación de proteínas tóxicas en la célula (51 y 24).

Evidencias experimentales muestran que en modelos de EP en ratas, luego de 30 días de una lesión provocada por una inyección intracerebral de la neurotoxina rotenona (rot) en la SNpc o el HMCA, la presencia de agregados de la proteína  $\alpha$ -sin en neuronas de la SNpc (7 y 34).

## **2) Alteración en mecanismos de degradación proteica como:**

Sistema ubiquitin-proteosomal (SUP): Las células poseen varios mecanismos para controlar los plegamientos anormales de proteínas. Los proteosomas son grandes complejos multi-proteicos que degradan proteínas que fueron marcadas por la ubiquitinación. Un grupo de enzimas ligasas (E1, E2 y E3) son responsables de marcar proteínas destinadas a la degradación, con ubiquitina.

Amplias evidencias sugieren una disfunción en SUP en la EP. CL contiene múltiples componentes de SUP (ubiquitina y proteosomas). En materiales de autopsia de pacientes con EP se vio que hay un 40% de disminución de actividad proteosomal selectivamente en SNpc (26). Parkina es una E3 ligasa y mutaciones en ésta son relacionadas con EP donde existe una disminución en la actividad ligasa. Se piensa que el estrés oxidativo deteriora el SUP, a través la oxidación de proteínas las cuales se vuelven más resistentes a la degradación proteosomal, posiblemente por la formación de agregados (10 y 24).

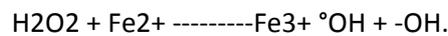
Vía Autofágica/ Lisosomal (VAL): Es sabido que la función basal de la VAL es importante para la función neuronal y en particular para la regulación de  $\alpha$ -sin. La forma wild type de  $\alpha$ -sin afecta su propia degradación por la VAL pero no afecta la función global de la vía. Sin embargo, los aductos de DA- $\alpha$ -sin bloquean la degradación de otros sustratos, sugiriendo un posible mecanismo en el que las células dopaminérgicas son más susceptibles a la toxicidad por  $\alpha$ -sin (24).

**3) Muerte celular y disfunción mitocondrial** La mitocondria es crítica para la regulación de la apoptosis. Una gran variedad de eventos claves en apoptosis están focalizados en las mitocondrias, como ser: la liberación de activadores de caspasas (ej: Citocromo C), cambios en el transporte de electrones, pérdida del potencial mitocondrial de trasmembrana, alteraciones en el proceso de óxido reducción celular, entre otros. Varios estudios evidencian que existe una disfunción del complejo I mitocondrial en SNpc de pacientes con EP (22). Además mutaciones en varias proteínas mitocondriales han sido asociadas con formas familiares de EP. Se cree que la reducción de la actividad del complejo I mitocondrial en EP, deriva en parte de acumulaciones de mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNm). La disfunción mitocondrial puede conducir a una insuficiencia de producción de ATP y generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO), la cual podría inhibir las vías citoprotectoras dependientes de ATP, como es la vía proteosomal, actividad chaperona, y bombas de calcio que regulan los niveles de calcio celular (24 y 39). Bajos niveles de ATP pueden también afectar procesos transcripcionales y traduccionales, que producen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, generando más estrés oxidativo por la falta de estas enzimas anti-oxidantes (21 y 15).

**4) Estrés Oxidativo y DA.** En los organismos aeróbicos la generación de ERO es una inevitable consecuencia de la dependencia de oxígeno para la respiración. ERO son generadas cuando existe una pérdida de electrones desde la cadena transportadora de electrones, lo cual resulta

en una reducción parcial de la molécula de oxígeno en superóxido. Además de la mitocondria, una fuente potencial de ERO que merece especial consideración es la DA en sí misma. La DA es una molécula altamente reactiva que puede ser oxidada y subsecuentemente reaccionar con componentes celulares para formar aductos o para formar más ERO tóxicos (51).

Normalmente la DA es efectivamente secuestrada en vesículas sinápticas, pero la DA citosólica puede ser tóxica para las neuronas. El catabolismo de la DA por la MAO genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) como bio-producto, el cual si no es metabolizado por la catalasa, puede ser convertido en radical hidroxilo o anión hidroxilo en presencia de hierro (Fe<sup>2+</sup>) a través de la reacción de Fenton:



El potencial oxidativo de la DA ha sido postulado como una posible razón de la susceptibilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (19 y 51).

Otros mecanismos implicados en la etiología de la EP incluye un aumento de la neuroinflamación (19), alteraciones de señales de proteínas quinasas (Akt, Cdk5, LRRK2) (54) y la pérdida de factores tróficos. Este último mecanismo podría explicar los hallazgos de diferentes estudios sugiriendo que uno de los eventos patológicos más tempranos en la EP es la degeneración de los axones de las neuronas dopaminérgicas, antes que la degeneración de sus somas. Esto ha llevado a proponer que la muerte de neuronas dopaminérgicas es una degeneración por muerte retrógrada (35 y 24).

#### IV) Tratamientos de la EP

Los tratamientos clínicos disponibles (farmacológicos y no farmacológicos) para la EP son sintomáticos y no detienen la propagación de la enfermedad, por lo que es muy importante la búsqueda de terapias alternativas (45).

Los tratamientos farmacológicos para enfermos de Parkinson apuntan a aumentar la transmisión dopaminérgica. Dado que la DA es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, la terapia con administración de DA a los pacientes de Parkinson no es viable. Sin embargo, el precursor de DA la Levodopa, ha demostrado ser efectiva mejorando los síntomas motores y es la terapia para la EP más usada. A pesar de esto, el tratamiento con Levodopa

puede inducir disquinesia y alucinaciones, en los pacientes sometidos a una terapia por 5 años o más (45 y 42).

Una de las alternativas más relevantes para la terapia de la EP es la actuación directa de agonistas (como la apomorfina) sobre receptores dopaminérgicos. Los agonistas dopaminérgicos modulan positivamente la neurotransmisión dopaminérgica y pueden ser empleados solos, para retrasar el uso de Levodopa, o en conjunto con Levodopa para aumentar su efectividad (45 y 42).

Por otro lado inhibidores de la enzima COMT (esta enzima puede actuar sobre las catecolaminas que se encuentran fuera de las neuronas) impiden la metabolización de la DA y cuando se utilizan en combinación con Levodopa aumentan su efecto terapéutico (45 y 42).

Múltiples otros candidatos han sido propuestos como posibles agentes beneficiosos para esta patología, la mayoría de los cuales se encuentran en fase preclínica o en ensayos clínicos. Como por ejemplo la nicotina (agonista de receptor nicotínico de acetil-colina), quelantes de hierro, vitaminas A, C y E, drogas que reducen la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína o que inhiben la apoptosis (propargylamina, inhibidor de caspasas), antioxidantes (tocoferol, flavonoides), drogas anti-inflamatorias (inhibidor de la ciclo-oxigenasa-2), también como antagonistas de receptores glutamato para reducir la excitotoxicidad. En adición a éstos, factores tróficos y agentes protectores de la función mitocondrial también han sido propuestos como agentes neuroprotectores. Todos estos compuestos proporcionan algún nivel de neuroprotección en estudios experimentales, pero han fallado cuando se ensayan en estudios clínicos (42).

Uno de los tratamientos clínico que está evolucionando favorablemente, es el trasplante de células que se diferencian a neuronas dopaminérgicas para reemplazar a las que degeneraron en la SNpc (23). Por otro lado, el trasplante de neuronas en pacientes con EP es un blanco para el desarrollo de procedimientos de terapia génica. Se han desarrollado muchos métodos virales y no virales para genes que codifican enzimas como la Tirosina Hidroxilasa, Guanosina Trisfosfato, Ciclohdroxilasa I, entre otras, las cuales todas aumentan la producción de DA. Sin embargo, los resultados en estos estudios han sido controversiales.

Luego de 5-10 años muchos pacientes alcanzan un estado en el cual las drogas antiparkinsonianas no continúan siendo adecuadas debido a que se desarrollan fluctuaciones motoras y disquinesias. Para estos pacientes la terapia quirúrgica puede ser crucial.

Una de las últimas metodologías utilizadas es la estimulación profunda del cerebro a alta frecuencia (del inglés, deep brain stimulation: DBS) tanto del Núcleo sub-talámico (NST) como

Globo Palido interno (GPi). La estimulación en ambas áreas del cerebro han mostrado una reversión de los signos parkinsonianos (32 y 42). Además el desarrollo de nuevas tecnologías como la neuro-imagenología ha renovado el interés en los métodos quirúrgicos (45).

A pesar de la gran variedad de tratamientos clínicos mencionados, no existen hasta el momento un tratamiento que detenga efectivamente el progreso de esta enfermedad. Debido a esto, es muy importante la exploración de nuevas terapias alternativas para el tratamiento de la EP y para esto es fundamental la comprensión de los mecanismos de muerte celular involucrados así como las bases neurobiológicas de la enfermedad. Para ello, modelos preclínicos adecuados son fundamentales.

## V) Modelos de EP experimentales

Varios modelos animales de EP se han empleado para el estudio de las bases neurobiológicas de la enfermedad y explorar potenciales terapias neuroprotectoras. Estos modelos clásicamente se basan en la aplicación de neurotoxinas que dañan selectivamente las neuronas dopaminérgicas de la SNpc e imitan algunas características morfológicas y bioquímicas de la enfermedad, permitiendo estudiar los procesos celulares que llevan a la degeneración neuronal (6 y 8). En la última década, se han sumado también diferentes modelos de animales transgénicos.

A continuación se describen algunos de los modelos con neurotoxinas y genéticos más utilizados.

### Modelos con neurotoxinas

Los modelos experimentales de EP más utilizados se basan en el uso de compuestos neurotóxicos, que dañan selectivamente las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Dentro de estos compuestos los más populares son: 6-hidroxydopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y rot (7). La puesta a punto en el laboratorio de modelos con toxinas es fácil de realizar, debido a que la manipulación es relativamente sencilla en

comparación con otros modelos, además de ser modelos económicos. Estas neurotoxinas pueden ser administradas por distintas vías, lo que determinará el tipo de modelo que se requiere. Algunas de las vías son: inyecciones intracraneal mediante estereotaxia en la SNpc, CE o en el HMCA. Por otro lado también existen modelos donde se inyectan las toxinas por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, oral e intranasal (8).

### Modelo de EP experimental con MPTP

La toxina MPTP fue una de las primeras en ser utilizadas para la generación de modelo de EP experimental. En ratones la MPTP es típicamente administrada de forma sistemática. MPTP es tomada primero por los astrocitos y convertida a su metabolito tóxico 1-metil-4-fenilpyridinium (MPP+). El MPP+ es captado por neuronas dopaminérgicas a través del transportador para DA, donde ejerce su efecto tóxico inhibiendo el complejo I mitocondrial, causando la degeneración de las neuronas. Esta toxina es ampliamente usada en estudios experimentales en ratones y monos, sin embargo no se puede utilizar en ratas ya que son insensibles a la misma (32). Por otro lado la utilización de esta toxina requiere medidas importantes de protección por parte del experimentador ya que atraviesa la barrera hematoencefalica. Por otra parte, la lesión causada en la SNpc no se acompaña de la formación de inclusiones celulares tipo CL, característica distintiva de la enfermedad.

### Modelo de EP experimental con 6-OHDA

La 6OHDA es un análogo hidroxilado de la DA que comparte algunas similitudes estructurales con la DA y noradrenalina, exhibiendo una alta afinidad por el transportador transmembrana catecolaminérgico. Consecuentemente, la 6-OHDA puede entrar tanto en neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas e inducir daño celular. Es bien aceptado que la 6-OHDA destruye estructuras catecolaminérgicas por una combinación de efectos de especies reactivas del oxígeno (ERO) y quinonas tóxicas (producto de su propia degradación). Esta toxina cruza débilmente la barrera hematoencefalica, por lo tanto para obtener una lesión cerebral, debe ser inyectada directamente en el cerebro por estereotaxia (14, 12 y 8).

El laboratorio de Neuroquímica del IIBCE cuenta con gran experiencia en el uso de la 6-OHDA administrada en la SNpc de la rata como modelo de EP, para estudiar la fisiopatología de esta enfermedad y explorar potenciales agentes neuroprotectores (12, 52 y 2). Sin embargo, al

igual que el MPTP, no induce la formación de estructuras tipo CL por lo que no reproduce un aspecto importante de la enfermedad.

### Modelo de EP experimental con Rotenona

En el presente trabajo de tesina se empleó otra neurotoxina: la rot. Esta es una molécula citotóxica natural que pertenece a la familia de las isoflavonas, extraída de la familia de las plantas *Leguminosas*. La rot es un conocido plaguicida que podría contribuir a la aparición de EP en personas que han tenido exposición a la toxina (40 y 17). Es sabido que productos químicos utilizados en la agricultura, como el pesticida rot puede inducir síntomas específicos parkinsonianos (4).

La rot cruza las membranas celulares y afecta la fosforilación oxidativa inhibiendo el Complejo I mitocondrial, reduciendo la actividad de la enzima nicotinamida adenina dinucleotido reductasa (7). Además de esta acción sobre la respiración mitocondrial, la rot también inhibe la formación de microtúbulos. Este efecto es importante para el mecanismo de neurodegeneración debido a que el exceso de monómeros de tubulina es tóxico para la célula (7).

En relación al valor de la utilización de rot como modelo para la EP, diversos estudios han demostrado que la inhibición sistemática del Complejo I por rot reproduce varias características de la enfermedad incluyendo un aumento del estrés oxidativo, inhibición de la actividad proteosomal, la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas y la formación de agregados proteicos tipo CL ricos en  $\alpha$ -sin (40, 56 y 29).

Varios trabajos han demostrado que la administración de rot de forma sub-cutánea produce un severo daño en órganos periféricos. Por lo tanto para evitar estos efectos secundarios la rot es administrada de forma directa en el CE, el HMCA o la SNpc (4 y 34).

Tanto rot como 6-OHDA y MPTP inducen estrés oxidativo y degeneración de las neuronas dopaminérgicas, sin embargo diversos estudios han demostrado que la agregación de la proteína  $\alpha$ -sin únicamente se observa con rot (8).

### Modelos genéticos

Se ha estimado que aproximadamente un 10-15% de todas las EP son causadas por alteraciones genéticas (3). En la última década se han hecho grandes avances en la

identificación de genes responsables de la EP familiar. Desde 1988, se han identificado mutaciones en 14 genes diferentes que causan EP familiar (3, 37 y 38). Basados en estos descubrimientos de mutaciones en genes humanos causantes de EP familiar, se han desarrollado varios modelos de animales transgénicos, que intentan reproducir las características de la enfermedad, entre ellos el gen de  $\alpha$ -sin (49). Sin embargo, el costo de estos modelos hace que en muchos laboratorios no puedan ser implementados.

## VI) Antecedentes particulares del laboratorio

El Departamento de Neuroquímica del IIBCE lleva a cabo una línea de investigación desde hace ya 15 años, que se centra en el estudio de agonistas de receptores nicotínicos (nAChR) como estrategia experimental para el tratamiento de la EP.

Utilizando el modelo de EP de lesión unilateral de SNpc con 6-OHDA en ratas, se demostró que la disminución de los niveles de DA en el CE, provocada por la inyección de 6-OHDA, es prevenida por la administración intermitente de nicotina, un agonista de los nAChR más potente aún que la misma Acetilcolina (ACh) (12, 52 y 1).

Este hecho impulsó a la búsqueda de nuevos agonistas nicotínicos más específicos y con menos efectos secundarios que la nicotina. Entre ellos, la citisina, así como derivados semi-sintéticos de ésta resultaron ser beneficiosos en el modelo de EP utilizando 6-OHDA, previniendo en parte la reducción de DA en el CE (2).

Para avanzar en los estudios de los efectos beneficiosos del agonismo nicotínico en EP, sería deseable estudiar si el tratamiento con estos agonistas también tienen efecto en otros aspectos de la fisiopatología de EP. Como se mencionó, diferentes estudios apuntan a la proteína  $\alpha$ -sin como clave en la enfermedad, ya que no solo es la principal componente de los CL, sino que también mutaciones en su gen o su sobreexpresión causan EP. Por ello, resulta de sumo interés estudiar si el agonismo nicotínico, ejerce alguna acción sobre las alteraciones que esta proteína sufre en la enfermedad. Sin embargo, la administración de 6-OHDA no genera agregados proteicos tipo CL, por lo que no parece ser un modelo adecuado para estudiar alteraciones en  $\alpha$ -sin. Por el contrario, los modelos de EP por administración de rot parecen ser más adecuados con este fin, ya que se ha reportado que inducen agregaciones citoplasmáticas tipo CL, ricas en  $\alpha$ -sin y ubiquitina. En este sentido, sería de gran interés contar con un modelo

de EP por administración de rot en el laboratorio, donde se pueda estudiar los efectos del agonismo nicotínico sobre las alteraciones que sufre la  $\alpha$ -sin.

## VII) Hipótesis

La inyección de rot unilateral provoca una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas y alteraciones de la proteína  $\alpha$ -sin en la SNpc ipsilateral.

## VIII) Objetivo general

Poner a punto un modelo de EP experimental en ratas utilizando la toxina rotenona.

## IX) Objetivos específicos

### **1: caracterización de la lesión inducida por rot a través de:**

- 1) Cuantificación de niveles de DA en la SNpc y CE
- 2) Cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas (TH positivas) en la SNpc
- 3) Determinación de los niveles de enzima TH en el CE

### **2: Determinación de alteraciones en la proteína $\alpha$ -sin inducidas por la lesión causada por rot:**

- 1) Identificación de la presencia de agregados de  $\alpha$ -sin en la SNpc luego de la lesión por rot
- 2) Determinación de la presencia de la forma fosforilada en la ser/129 de  $\alpha$ -sin en la SNpc

## X) Materiales y Métodos

### **Animales y grupos experimentales**

**Animales:** Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (Tabla 1) de 230-260g, criadas y mantenidas en el bioterio del IIBCE en un microambiente con temperatura controlada (20-22°C), ciclo luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso al agua y alimento.

Tabla 1: Grupos experimentales. En todos los grupos se utilizó un número de animales entre 6-10

Nombre del Grupo	Lugar de inyección	Tiempo post lesión	Dosis Rotenona
G: Sn 12ug/8 días	SNpc	8 días	12 ug
G: Sn 12ug/1 mes	SNpc	1 mes	12 ug
G: Sn 9, 7, 5 y 3ug/1mes	SNpc	1 mes	9, 7, 5 y 3 ug
G: HMCA 1ug/8 días	HMCA	8 días	1 ug
G: HMCA 0,5 ug/8 días	HMCA	8 días	0.5 ug
G: HMCA 1ug/1 mes	HMCA	1 mes	1 ug

### Inyección intracerebral de Rotenona

La cirugía estereotáxica es un tipo de intervención quirúrgica que utiliza un sistema de coordenadas tridimensional para localizar pequeñas estructuras dentro del cuerpo. La cirugía estereotáxica se utiliza en investigación con diferentes tipos de estudios con animales. El principal uso es para la introducción de fármacos en puntos específicos del cerebro, que de otra manera no serían capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. En roedores, la aplicación más común es la introducción directa de fluidos, o bien implantación de una cánula o un aparato de microdiálisis.

#### Procedimiento quirúrgico:

Los animales fueron anestesiados con Ketamina/ Xilasina (80 y 5 mg/kg i.p, respectivamente) y colocados en un estereotáxico (D. Kopf) para inyectar rot en la SNpc o el HMCA del lado derecho del animal y se utilizó el lado izquierdo como control sin lesión. Para esto se realizó una perforación en el cráneo y se introdujo una jeringa Hamilton acoplada a una unidad de micro inyección (D. Kopf) utilizando las siguientes coordenadas (en mm) a partir de Bregma de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (30): para la inyección en la SNpc: AP: -5,0 / L: -2,2 / V: 7,0 y para HMCA: AP: -3,5/ L: 1,5/ y V: 7,8. (Fig. 4) En todos los grupos experimentales, el volumen total de inyección fue de 1ul. Como vehículo de rot, se utilizó dimetil sulfoxido (DMSO) en los grupos experimentales inyectados en la SNpc y DMSO/propilenglicol (1:1) en los grupos experimentales inyectados en el HMCA.

Luego de la cirugía, los animales fueron suturados, mantenidos en el laboratorio bajo observación hasta que se recuperaron de la anestesia y trasladados al bioterio del IIBCE hasta el momento de su sacrificio.

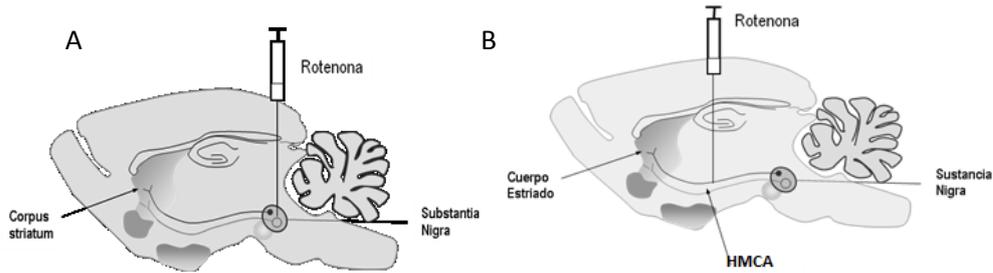


Figura 4: **A: Modelo de EP experimental:** se indujo la muerte de las neuronas dopaminérgicas inyectando por estereotaxia la toxina rot unilateralmente en la SNpc (**lesión en SNpc**) (A) o en el HMCA (**lesión en HMCA**) (B) de las ratas.

## Evaluación Morfológica: Inmunohistoquímica

### Procesamiento del tejido

A los 8 días o 1 mes luego de la lesión, los animales fueron anestesiados con Uretano (2ml/Kg) por vía intraperitoneal. 0.1ml de anticoagulante Heparina (al 50%) se inyectó en el ventrículo izquierdo del corazón y se realizó la perfusión transcardiaca con solución salina (60ml) seguida de fijación con paraformaldehído (PFA) al 4 % (250ml) con sucrosa al 5% como criopreservante. Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor.

Posteriormente se disecó el cerebro y se fijó por inmersión en PFA 4%/ sucrosa 5% durante 2 horas a 4°C, seguido de crioprotección en sucrosa al 15% durante 24 horas y al 30% durante 48 horas a 4 °C. Los cerebros fueron mantenidos a -80°C hasta ser seccionados en cortes coronales de 20 um de espesor en criostato a -20°C. Los cortes se recogieron en portaobjetos gelatinizados a la altura de las siguientes coordenadas según el atlas de Paxinos y Watson: CE: desde 0,7 a 1,5 mm y SNpc: desde -4,5 a -6,4 mm. Para los grupos que se inyectó la toxina en HMCA también se levantaron cortes correspondientes a la zona del HMCA usando las coordenadas: desde -3,3 a 4,5 mm según el atlas de Paxinos y Watson, con el objetivo de poder visualizar el sitio de inyección de la toxina (HMCA). Los cortes se conservaron a -21°C hasta el momento de su uso.

### Inmnohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica utilizada para detectar antígenos tisulares mediante la reacción antígeno-anticuerpo. Para detectar esta reacción el anticuerpo específico (inmunotinción directa) o el anti-anticuerpo (inmunotinción indirecta) deben estar marcados con una sustancia (por ejemplo un fluoróforo) que absorbe o emite luz o produce coloración.

### **Protocolo**

Los cortes seleccionados según las coordenadas que se quisieron estudiar, fueron incubados toda la noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente con un anticuerpo específico anti -TH policlonal generado en conejo (Thermo) y diluido 1:500 en diluyente A más suero de cabra (suero del animal donde fue generado el anti-anticuerpo). El diluyente A contiene: PBS (Bueffer Fosfato Salino, PH= 7,3), Tritón 0,1%, Azida de Sodio 0,012M y D-L-Lisina 0,0054M. Tanto el diluyente A como el suero de cabra bloquean los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos. Al final del periodo de incubación los cortes fueron lavados en PBS para eliminar los anticuerpos no unidos al antígeno. Posteriormente se incubó el anti-anticuerpo, generado en cabra y marcado con el fluoróforo Alexa 488 anti-ratón, diluido 1:800 en la misma solución que el anticuerpo específico con omisión del suero, durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

Para los estudios de co-marcados se utilizaron anticuerpos específicos: 1) anti-TH monoclonal generado en ratón (1:400) (Millipore)/ anti- $\alpha$ -sinucleína policlonal generado en conejo (1:1000) (Chemicon) y 2) anti-TH monoclonal (1:400)/ anti- $\alpha$ -sinucleína-fosforilada policlonal generado en conejo (1:1000) (Chemicon). Los anti-anticuerpos conjugados a los fluoróforos Alexa 488 anti-ratón y Alexa 546 anti-conejo, ambos diluido 1:800 fueron utilizados para los comarcados.

Luego del tiempo de incubación los cortes fueron lavados con PBS para eliminar los anti-anticuerpos que no se unieron a los anticuerpos específicos. Los resultados se analizaron mediante microscopia utilizando un microscopio confocal, Leica, TCS SP2 o un microscopio invertido de epifluorescencia Olympus IX81.

### **Protocolo con desenmascaramiento**

Para la detección de la agregación de la proteína  $\alpha$ -sin, se utilizó un protocolo en donde previo a la incubación con el anticuerpo, se trató los tejidos con ácido fórmico durante 1 minuto. El objetivo de este tratamiento es degradar proteínas solubles, de forma de que únicamente sobrevivan al tratamiento los agregados de proteínas.

Los cortes son tratados con ácido fórmico durante 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se realizaron lavados con buffer de bloqueo (PBS+ Lisina (0,0054M) + Suero normal de cabra (5%) y se incubaron los cortes con los anticuerpos específicos: anti-TH monoclonal generado en ratón (1:400) (Millipore) y anti- $\alpha$ -sinucleína policlonal generado en conejo (1:1000) (Chemicon), durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente se realizan lavados con el buffer de incubación (PBS + Lisina) de forma de eliminar los anticuerpos no unidos al antígeno. Se procedió a la incubación con los anti-anticuerpos conjugados a los fluoróforos Alexa 488 y 546 anti ratón y anticonejo, respectivamente. Por último se realizaron lavados con el buffer de incubación para eliminar los anticuerpos secundarios que no se unieron al anticuerpo primario.

### **Análisis de los datos**

Se realizó conteo del número de células TH positivas en la SNpc utilizando el contador de células del programa Image J. Los resultados fueron expresados como la media de la relación entre el número de células TH-positivas en el lado lesionado y el no lesionado  $\pm$  el desvío estándar (SD). Para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales se realizó el test de ANOVA de una cola seguido por el test de Tukey.

### **Cuantificación de los niveles tisulares de DA**

La cromatografía es un método de separación física, en la cual, la separación de los distintos componentes de una mezcla, se basa en las diferentes retenciones que experimentan los componentes de la misma al pasar a través de una fase estacionaria, cuando la muestra es eluida por una fase móvil líquida. Así, la separación de los componentes de la muestra se produce debido a sus interacciones entre una fase líquida y una fase estacionaria sólida, contenida en una columna cromatográfica. En este trabajo se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (del inglés: High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, HPLC-ED). Se utilizó la separación por fase reversa en la cual la separación consiste en una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Aquí las moléculas se unen hidrofóticamente a ligandos no polares en presencia de un solvente polar y los analitos más polares son los que eluyen primero. Los ligandos más comunes son los grupos octil y octadecil. Se utilizó un detector electroquímico

que se basa en la medición de la corriente eléctrica resultante de la conversión oxidativa o reductiva de un analito en la superficie del electrodo. La DA es una molécula altamente oxidable, que puede ser fácilmente detectada con un detector electroquímico midiendo la corriente eléctrica que se genera cuando ésta se oxida (46).

Para la cuantificación de DA en el cerebro, los animales fueron sacrificados a los 8 y 30 días después de la inyección de rot o vehículo (DMSO). Los cerebros se removieron rápidamente, luego se disecó la SNpc y el CE (derecho e izquierdo) y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

Las muestras fueron pesadas, sonicadas en ácido perclórico 0.1M (300 y 1000 $\mu\text{l}$  para la SNpc y el CE respectivamente) y centrifugadas (15000 g) por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se inyectaron 50 $\mu\text{l}$  del sobrenadante en un HPLC-ED, donde se obtuvo la cuantificación de DA. El análisis cuantitativo se basa en la comparación de la altura o área de pico del analito con la de un estándar.

El sistema HPLC-ED cuenta con una columna C-18 (partículas 5 $\mu\text{m}$ , poros 100 $\text{\AA}$ , 150 mm X 4.6 mm; Phenomenex, USA) y un detector electroquímico (LC-4C BAS) con potencial oxidativo de +0.65 V (electrodo de trabajo de carbón vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl). La fase móvil estaba compuesta por ácido cítrico (0.15 M), octil-sulfato de sodio (0.6 mM), 4% de acetonitrilo y 1.5% de tetrahidrofurano, pH=3, tasa de flujo 1.2 ml/min.

### **Análisis de los datos**

Los resultados fueron expresado como ng de DA por gramo de tejido (ng/g tejido).

Para comparar entre las distintas dosis de rot los resultados fueron expresados como porcentaje de los niveles de DA del lado lesionado (derecho) con respecto al lado no lesionado (izquierdo) (%D/I). Para evidenciar diferencias entre los grupos, los datos fueron analizados mediante el test de *t-Student* o en el caso de que existan más de dos grupo se realizó el test ANOVA de una cola seguido por el test de Tukey.

### **Determinación de los niveles de la enzima TH**

Los niveles de enzima TH fueron obtenidos mediante la técnica de Western Blotting.

El Western Blotting (WB) o inmunoblotting, es una técnica analítica utilizada para detectar proteínas específicas de una muestra determinada. Las proteínas son separadas por electroforesis en gel desnaturizante utilizando el peso molecular como criterio de separación. Luego son transferidas a una membrana absorbente de PVDF. Posteriormente se

buscó la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Para evitar la inespecificidad de unión se procedió al bloqueo de la membrana previo a la colocación de los anticuerpos específicos en la membrana. Finalmente se detectó la unión antígeno-anticuerpo, (siendo el antígeno la proteína a estudiar), donde la intensidad de la señal se toma como proporcional a la cantidad del antígeno en la superficie de la membrana y por ende a la cantidad de proteína específica. La cuantificación de la proteína tubulina fue usada como control de carga para el Western Blot y los resultados fueron normalizados respecto a la concentración de tubulina y expresados como porcentaje del hemisferio lesionado respecto al no lesionado.

### **Cuantificación de proteínas**

Se disecó el cuerpo estriado de cada hemisferio de las ratas, se le agregó 400ul de Buffer de Lisis (BL) (PBS 1X, EGTA 0,003M, EDTA 0,001M, Inhibidor de proteasas 25X) por cada muestra, luego se sónico y centrifugó (15000 g) por 15 minutos a 4°. Se toman 2ul de sobrenadante cada muestra y se carga los pocillos de la placa para la posterior lectura espectrofotométrica. La cuantificación proteica de cada muestra se realizó utilizando el kit de ácido bicinonínico (BCA, Sigma USA) para determinación de proteínas. Las proteínas reducen en medio alcalino Cu(II) a Cu(I) de una manera dependiente de la concentración. BCA es un agente reactivo cromagénico para Cu(I) formando un complejo con un máximo de absorbancia a 562nm. Debido a esta propiedad, la absorbancia resultante a 562nm es directamente proporcional a la concentración de proteína. En cada pocillo con las distintas muestras se le agrega 150ul de reactivo BCA que detecta la cantidad de proteína en la muestra. De esta manera, con la lectura de la absorbancia de cada muestra y la utilización de una curva stock de proteína BSA (albumina bovina), se cuantificó las proteínas en las muestras.

Una vez conocida la concentración proteica de las muestras, se tomó un volumen correspondiente a 80ug de proteína y se le agregó 5ul de buffer de muestra (10% SDS, 50% glicedrol, 25%  $\beta$ -mercapto etanol, 0,3125M Tris pH: 6,8 y 0,05% Bromofenol blue). Se completó a un volumen de 20ul para cada muestra con BL.

### **Electroforesis en gel (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)**

Las proteínas son separadas mediante una corrida electroforética en condiciones desnaturizantes utilizando SDS (Sodio Dodecil Sulfato), un detergente aniónico que

desnaturaliza las proteínas, eliminando sus estructuras secundaria y terciaria. En adición a esto el SDS confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa, por lo que las proteínas adquieren una relación carga/masa idéntica, de modo que se puede asumir que la distancia de migración en el gel es proporcional únicamente al tamaño de la proteína desplegada (longitud de su cadena, al número de amino ácidos, al peso molecular).

De este modo, la estructura tridimensional de las proteínas no existe y por lo tanto no influye en la electroforesis, y pueden separarse únicamente en función del tamaño.

Para la corrida electroforética se utilizó un gel de acrilamida 12%. Se cargó en cada pocillo 20ul de muestra y la corrida fue a 100 Voltios, durante 1 hora y 30 minutos. En la tabla 2 se muestra la composición del gel separador y el concentrador utilizados. La función del gel separador consiste en separar los distintos componentes de la muestra de acuerdo al peso molecular, mientras que el gel concentrador genera la entrada de las proteínas al gel concentrador en el mismo momento.

Tabla 2: Composición del gel Separador y Concentrador

Gel	Separador (12%)	Concentrador
H2O	4,8ml	2,8ml
30% Acril/Bis	6ml	660ul
Tris	3,9ml (PH=8,8)	500ul (PH= 6,8)
10% SDS	150 ul	40ul
10% PSA	150ul	40ul
Temed	6ul	4ul

### **Transferencia**

Para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos, se las transfiere desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF. En este caso se realizó una electrotransferencia la cual consiste en la aplicación de un campo eléctrico para llevar las

proteínas desde el gel hacia la membrana. Esta electrotransferencia se realizó por 1 hora y 15 minutos a 100 voltios y 300 mA.

### **Incubación de la membrana con anticuerpos**

Previo a la incubación de la membrana con los anticuerpos (anti-TH y anti-tubulina), se procedió al bloqueo de la membrana con leche en polvo al 5% en PBS-Tween (PBS-T), con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. El PBS-T es un buffer con detergente cuya función es permeabilizar las membranas y permitir el acceso del anticuerpo a las células. Luego de lavar para retirar la solución de bloqueo (leche), se incubó la membrana con anticuerpos anti-TH policlonal (generado en conejo, 1:1000, Thermo) y anti-tubulina monoclonal (generado en ratón, 1:200, Sigma-Aldrich), ambos en solución 3% leche en PBS-T durante toda la noche a 5°C con agitación. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con PBS-T y se incubó 1 hora con agitación a temperatura ambiente con los anti-anticuerpos anti-TH (IgG de conejo generado en cabra, 1:8000, DyLight 800, Thermo) y anti-tubulina (IgG de ratón generado en cabra, 1:10000, DyLight 650, Thermo). Luego se realizaron 4 lavados con PBS-T y se agregó PBS 1x a la membrana.

### **Análisis de los datos**

Para el revelado de las bandas en la membrana se utilizó el escáner Image Reader FLA:9000. Por último se realizó el análisis de los resultados mediante el programa informático de imagen Image J, donde se cuantificó por densidad óptica la intensidad de las bandas de la membrana. Los resultados fueron normalizados respecto a la concentración de tubulina y expresados como porcentaje del hemisferio lesionado respecto al no lesionado. Para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales se realizó el test de ANOVA de una cola seguido por el test de Tukey.

## **XI) Resultados**

### **1. Curva rotenona: niveles de DA**

Como primera aproximación para determinar la dosis adecuada, se realizó una curva dosis-respuesta de la inyección unilateral de rot en la SNpc, sobre los niveles de DA en el CE.

**Efecto de la administración de rotenona sobre los niveles de DA en el CE**

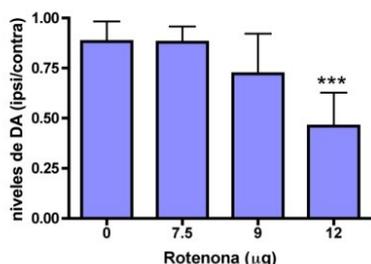


Figura 5: Curva dosis-respuesta 8 días post-lesión, efecto de inyección unilateral de rot en la SNpc, sobre los niveles de DA en el CE analizados por HPLC-ED y expresados como ng/g de tejido. Los datos son expresados como la media de la relación entre los niveles de DA en el lado inyectado y el no inyectado  $\pm$  DE. \*\*\* =  $p < 0.001$  vs 0ug de rot, test de ANOVA de una cola seguido por test de Tukey.

La administración de rot causó una reducción de los niveles de DA en el lado inyectado con respecto al lado intacto, evaluado 8 días post-lesión. El grado de reducción fue dependiente de la dosis de rot (Fig. 5). Se eligió la dosis 12ug de rot para los siguientes experimentos, debido a que ésta causó una disminución del 60% (% lesionado/no lesionado) de niveles de DA, reducción adecuada para ensayar futuros procedimientos protectores.

## 2. Modelo: inyección de 12ug de rot en SNpc

### 2.1 Niveles DA

Los niveles remanentes de DA luego de 8 días de la lesión con 12ug de rot fueron del 40% en el CE. Esta disminución fue significativa con respecto a los niveles de DA de los animales inyectados con el vehículo (DMSO) (87% de DA remanente). En la SNpc lesionada los niveles de DA fueron de un 42% con respecto al lado no lesionado. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los efectos de la rot y el vehículo en la SNpc (Fig. 6).

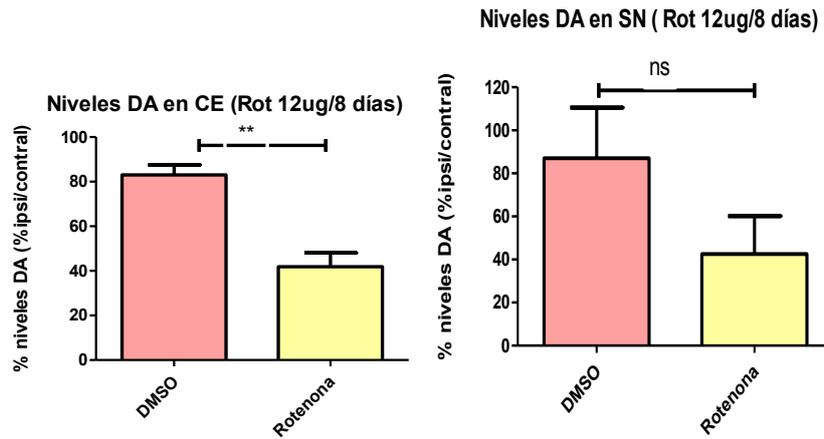


Figura 6: - Niveles DA obtenidos a partir de la técnica de HPLC, frente a una lesión causada por rot (12ug, sacrificio 8 días post-lesión). Los datos son expresados como la media de la relación entre los niveles de DA en el lado inyectado y el no inyectado  $\pm$  SD. Se realizaron tests de *t-Student*: \*\* =  $p < 0.001$ , ns = no significativo.

## 2.2) Niveles enzima TH

Los resultados obtenidos muestran que la lesión causó una disminución significativa en los niveles de la enzima TH en el CE analizado a los 8 días post-lesión. (Fig. 7).

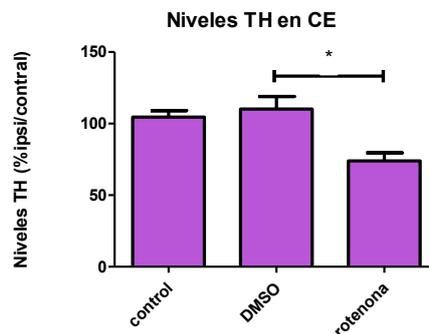


Figura 7: Niveles de TH obtenidos a partir de la técnica Western Blot (wb), frente a una lesión causada por rot (12ug, sacrificio 8 días post-lesión). Los datos son expresados como la media de la relación entre los niveles de TH en el lado inyectado y el no inyectado  $\pm$  SD. \* =  $p < 0.05$ , test de ANOVA de una cola seguido por test de Tukey.

## 2.3) Número de células TH positivas en SNpc

En estos estudios se evaluaron los efectos de rot tanto a los 8 como a los 30 días, ya que la literatura describe que luego de 30 días de la administración de la toxina se observa la presencia de agregados de  $\alpha$ -sin en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (7 y 34).

La administración de 12ug de rot en la SNpc causó una disminución significativa en el número de neuronas TH-positiva de la SNpc en el lado lesionado con respecto al lado contralateral, a los 8 y 30 días post-lesión. El número de células remanentes observado fue de 9,5 y 1 % luego de 8 y 30 días post-lesión, respectivamente (Fig. 8).

Los cortes cerebrales de las ratas inyectadas con rot, mostraron una gran lesión inespecífica (ausencia de tejido) a nivel de la SNpc del hemisferio lesionado que abarca aproximadamente la mitad de la misma, tanto para los 8 como a los 30 días post-lesión (Fig. 9 y 10). En los animales inyectados con el DMSO también se observó un menor número de células con respecto al lado no inyectado, aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa.

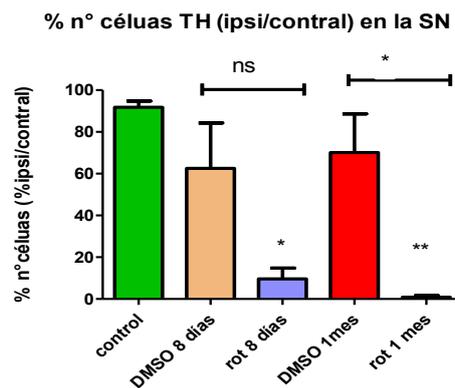


Figura 8: **Porcentaje del número de células TH-positivas remanentes obtenido por inmunohistoquímica. Lesión causada por una dosis de rot de 12ug, sacrificio 8 días o 1 mes post-lesión.** Los datos son expresados como la media de la relación entre el número de células TH positivas en el lado inyectado y el no inyectado  $\pm$  SD. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$  vs control, ns = no significativo, test de ANOVA seguido por test de Tukey.

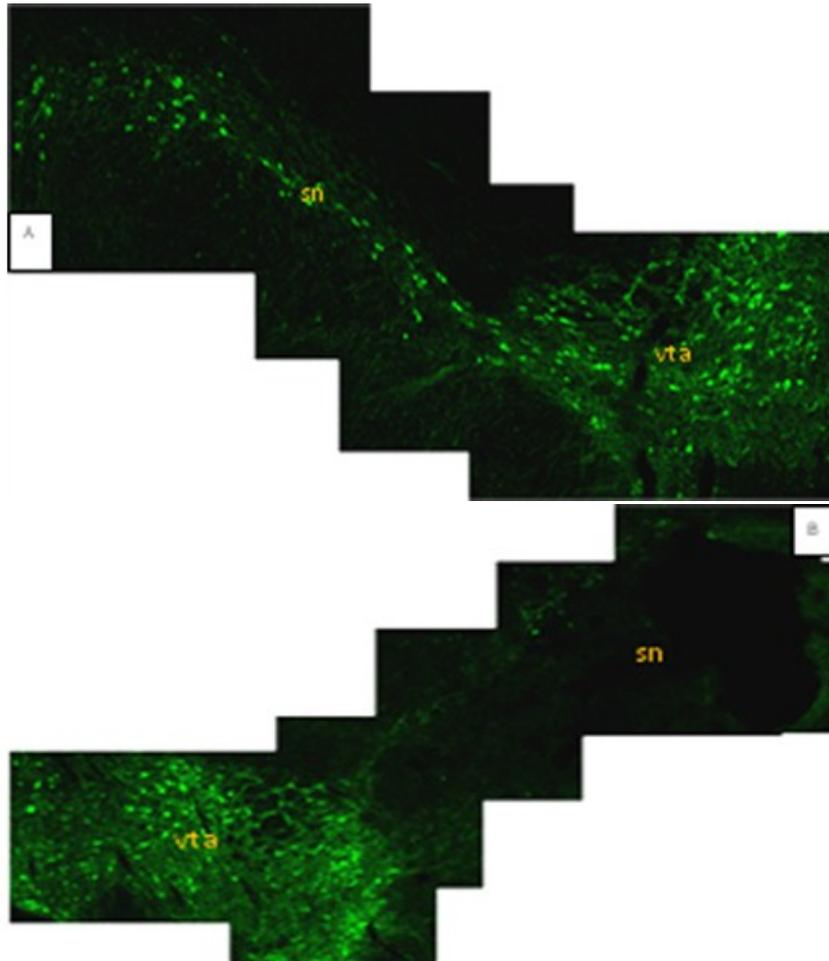


Figura 9: Efecto de la inyección unilateral de 12ug de rot en la SNpc a los 8 días post- lesión. Se observan las neuronas TH-positivas en verde de un corte coronal, (coordenada -5,00 desde Bregma) correspondientes al área tegmental ventral (vta) y sustancia nigra (sn). A: Lado no lesionado y B: lado lesionado. Microscopia de epifluorescencia

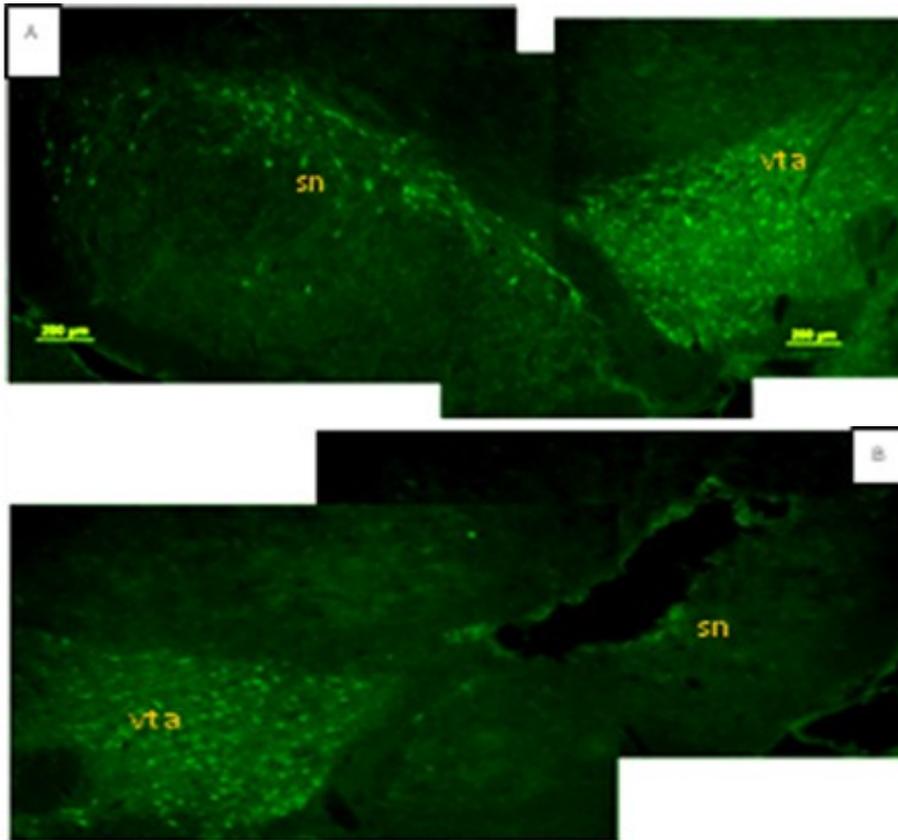


Figura 10: Efecto de la inyección unilateral de 12ug de rot en la SNpc a 30 días post- lesión. Se observan las neuronas TH positivas en verde de un corte coronal, (coordenada -5,00 desde Bregma) correspondientes al área tegmental ventral (vta) y sustancia nigra (sn). A: Lado no lesionado y B: lado lesionado. Microscopia de epifluorescencia

Si bien existe una disminución en el número de células en el lado inyectado con DMSO con respecto al no inyectado, no se observa ausencia de tejido como sucede con los tejidos de ratas tratadas con rot (Fig. 11). La disminución en el número de células en el lado inyectado con DMSO es prácticamente el mismo tanto a los 8 como a los 30 días.

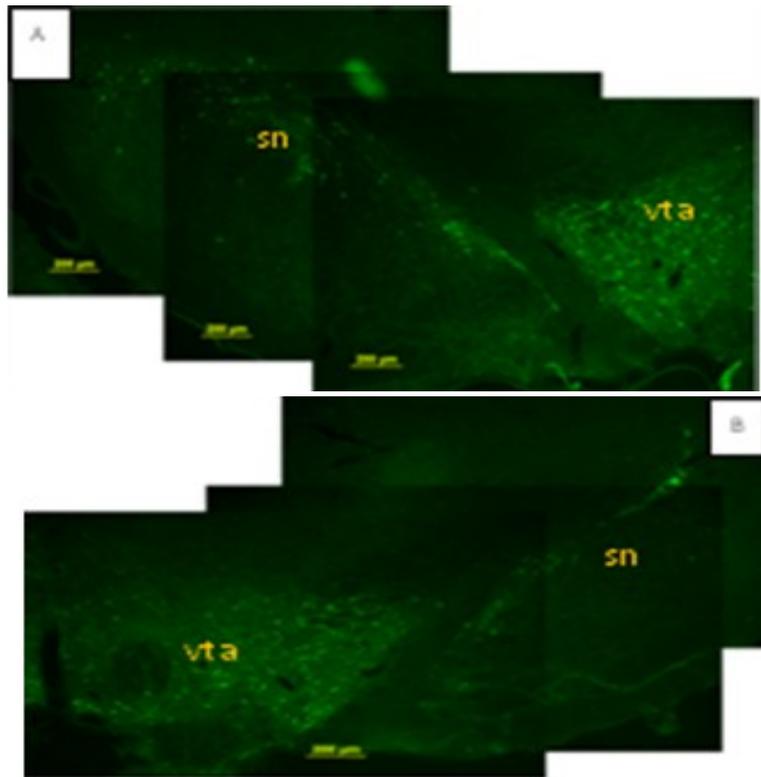


Figura 11: Efecto de la inyección unilateral DMSO en la SNpc a los 30 días post- lesión. Se observan las neuronas TH-positivas en verde de un corte coronal, (coordenada -5,00 desde Bregma) correspondientes al área tegmental ventral (vta) y sustancia nigra (sn). A: Lado no lesionado y B: lado lesionado. Microscopia de epifluorescencia

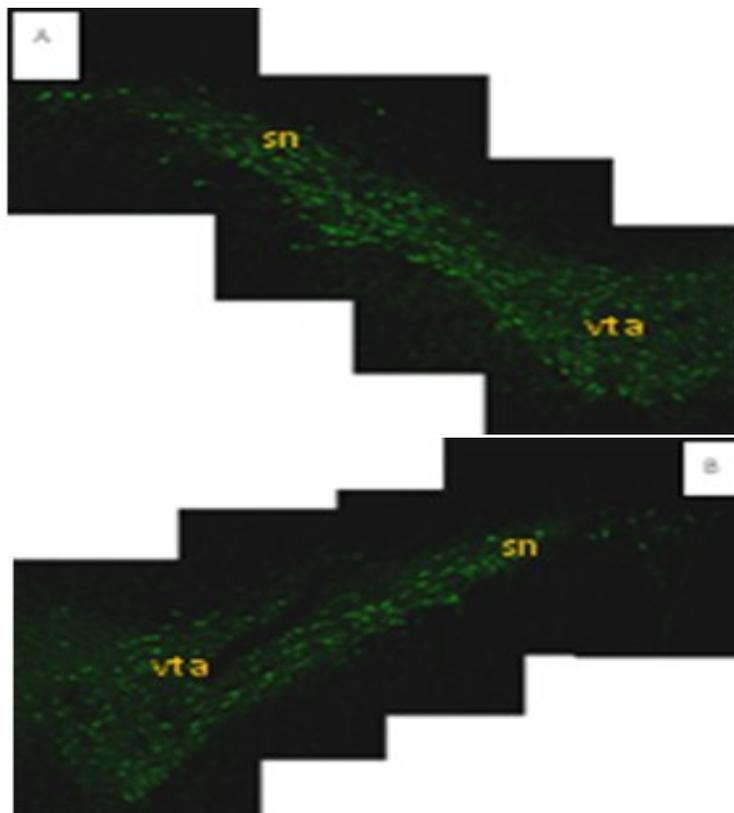


Figura 12: Imagen de un corte de la SNpc de un animal control. Se observan las neuronas TH positivas en verde de un corte coronal, (coordenada -5,00 desde Bregma) correspondientes al área tegmental ventral (vta) y sustancia nigra (sn). A: hemisferio izquierdo y B: hemisferio derecho del animal. Microscopia de epifluorescencia

Estos resultados muestran que el daño inducido con esta dosis de rot es muy severo e inespecífico, lo que no es lo buscado en este modelo de EP, que será utilizado para la búsqueda de posibles agentes protectores.

### 3) Curva dosis-respuesta, 30 días post-lesión

#### **Evaluación de los efectos de dosis menores de rot inyectados en la SNpc 30 días post-lesión**

Debido al daño inespecífico observado con la dosis de 12ug de rot, se evaluaron los efectos de dosis menores de rot a los 30 días post-lesión sobre los niveles de DA en el CE y la morfología del tejido a nivel de la SNpc. Los niveles de DA observados en el lado lesionado fueron de 40, 70, 76 y 79 % para las dosis de 9, 7, 5 y 3 ug, respectivamente (Fig. 13). Los estudios de inmunohistoquímica evidenciaron que la lesión inespecífica en la SNpc disminuye de tamaño pero permanece, aún en la dosis más baja (datos no mostrados).

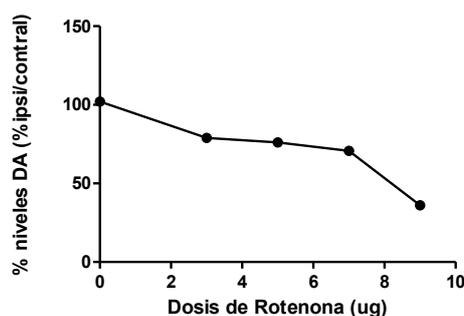


Figura 13: ***Evaluación de los efectos de dosis menores de rot inyectados en la SN 30 días post-lesión. Niveles DA obtenidos a partir de la técnica de HPLC, frente a lesiones causada por distintas dosis rotenona (9, 7, 5 y 3ug), la dosis 0ug corresponde al vehículo de rot, el DMSO.*** Los datos son expresados como la media de la relación entre los niveles de DA en el lado inyectado y el no inyectado  $\pm$  SD. Se realizó test de ANOVA de una cola seguido por test de Tukey: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.001$ , ns = no significativo. Figura B: Curva dosis-respuesta, rotenona (9, 7, 5 y 3ug).  $R^2$ : 0,7526. Al sacar dosis 9ug  $R^2$ : 0,97.

### 4) Modelo: inyección en HMCA de 1ug y 0,5ug de rot

Con el objetivo de poder evitar la lesión inespecífica causada por la inyección de la toxina directamente en la SNpc, se administró la misma en el HMCA.

Debido a que al inyectar en este haz de axones, se está inyectando en prácticamente todos los axones de las neuronas dopaminérgicas que inervan el CE, se decidió inyectar dosis menores a las evaluadas anteriormente, incluso aquellas que al los 30 días no generan una significativa muerte celular al inyectar directamente en la SNpc (5 y 3ug de rotenona). Por lo tanto se inyectaron las dosis: 1 y 0,5ug de rot en el HMCA. Dado que el vehículo utilizado en los experimentos causó cierto daño, decidimos disminuir el mismo con Propilen Glicol (PGL) (DMSO/PGL 1:1), de forma de poder reducir la concentración del DMSO.

#### **4.1) Número de células TH positivas 8 días:**

Se evaluaron por inmunohistoquímica las dosis de 1 y 0,5ug de rot inyectada unilateralmente en el HMCA a los 8 días post-lesión de forma de evidenciar tempranamente la muerte celular (Fig. 14). Los resultados muestran que ambas dosis de rot disminuyen el número de neuronas TH-positiva en la SNpc con ausencia de daño inespecífico (Fig. 15 y 16). Ya que la dosis de 1ug causa una disminución de 30 % de células TH-positivas a los 8 días, se decidió investigar si la muerte continúa progresando en el tiempo. Para ello se evaluó la muerte celular a los 30 días post-lesión, ya que a este tiempo es esperable encontrar agregados de  $\alpha$ -sin (7 y 34).

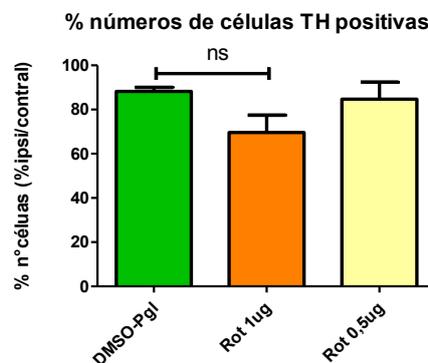


Figura 14: **Porcentaje del número de células TH-positivas remanentes obtenido por inmunohistoquímica. Lesión causada por una dosis de rot de 1ug o 0,5ug, sacrificio 8 días post-lesión.** Los datos son expresados como la media de la relación entre el número de células TH positivas en el lado inyectado y el no inyectado  $\pm$  SD. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$  vs DMSO-pgl, ns = no significativo, test de ANOVA seguido por test de Tukey.

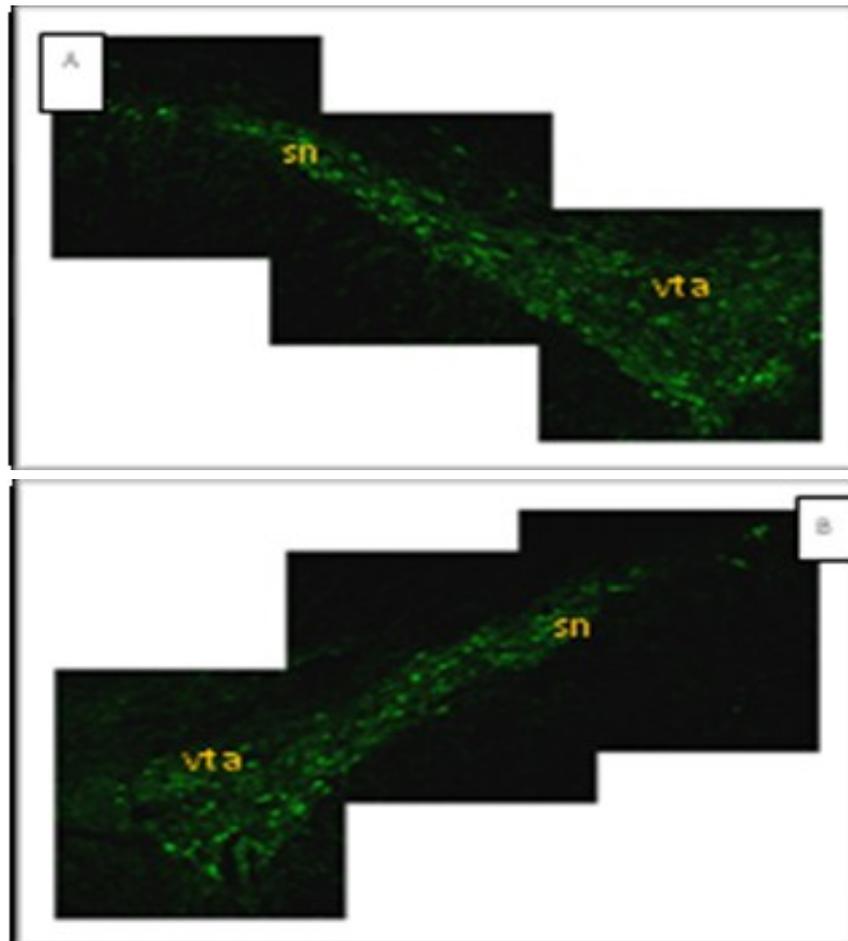


Figura 15: Efecto de la inyección unilateral de 1ug de rot en el HMCA a 8 días post- lesión. Se observan las neuronas TH positivas en verde de un corte coronal, (coordenada -5,00 desde Bregma) correspondientes al área tegmental ventral (vta) y sustancia nigra (sn). A: lado no lesionado y B: lado lesionado. Microscopia de epifluorescencia.

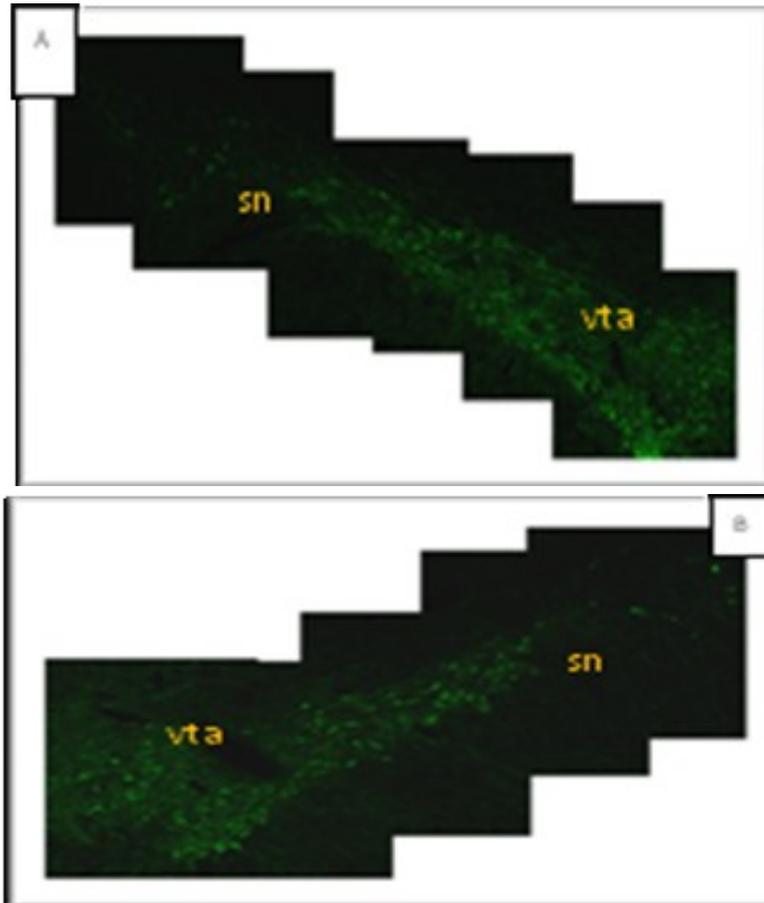


Figura 16: Efecto de la inyección unilateral de 0,5ug de rot en la HMCA a 8 días post- lesión. Se observan las neuronas TH positivas en verde de un corte coronal, (coordenada -5,00 desde Bregma) correspondientes al área tegmental ventral (vta) y sustancia nigra (sn). A: lado no lesionado y B: lado lesionado. Microscopia de epifluorescencia.

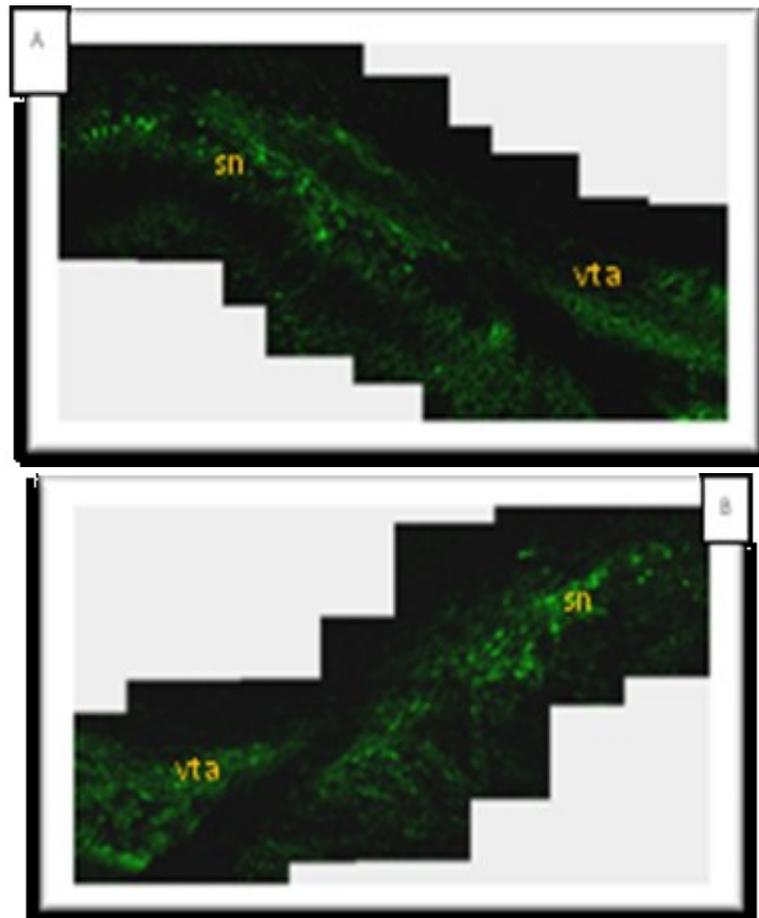


Figura 17: Efecto de la inyección unilateral de 1ul de DMSO-PGL en el HMCA a 8 días post- lesión. Se observan las neuronas TH positivas en verde de un corte coronal, (coordenada -5,00 desde Bregma) correspondientes al área tegmental ventral (vta) y sustancia nigra (sn). A: lado no lesionado y B: lado lesionado. Microscopia de epifluorescencia.

#### 4.2) Número de células TH positivas 30 días post-lesión

Al inyectar la dosis de 1ug de rot unilateralmente en el HMCA y evaluar el tejido 30 días post-lesión, se obtuvo un 60% de muerte de neuronas TH-positivas en el lado lesionado con respecto al no lesionado. Por otro lado, el vehículo utilizado, el DMSO-PGL, causó un 20% de muerte celular, sin observarse muerte inespecífica.

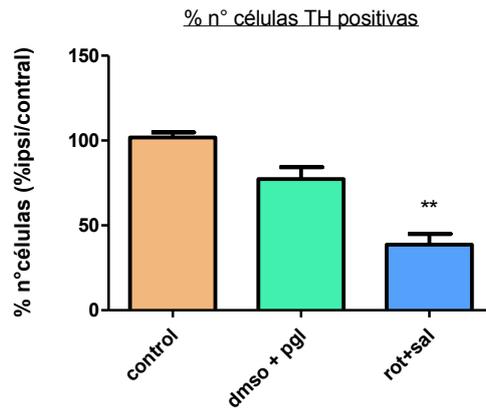


Figura 18: **Porcentaje del número de células TH-positivas remanentes obtenido por inmunohistoquímica.** Lesión causada por una dosis de rot de 1ug inyectado en el HMCA unilateralmente y sacrificio 30 días post-lesión. Los datos son expresados como la media de la relación entre el número de células TH positivas en el lado inyectado y el no inyectado  $\pm$  SD. \*\* =  $p < 0.001$  con respecto al dms + propilen glicol (pgl). Test de ANOVA seguido por test de Tukey.

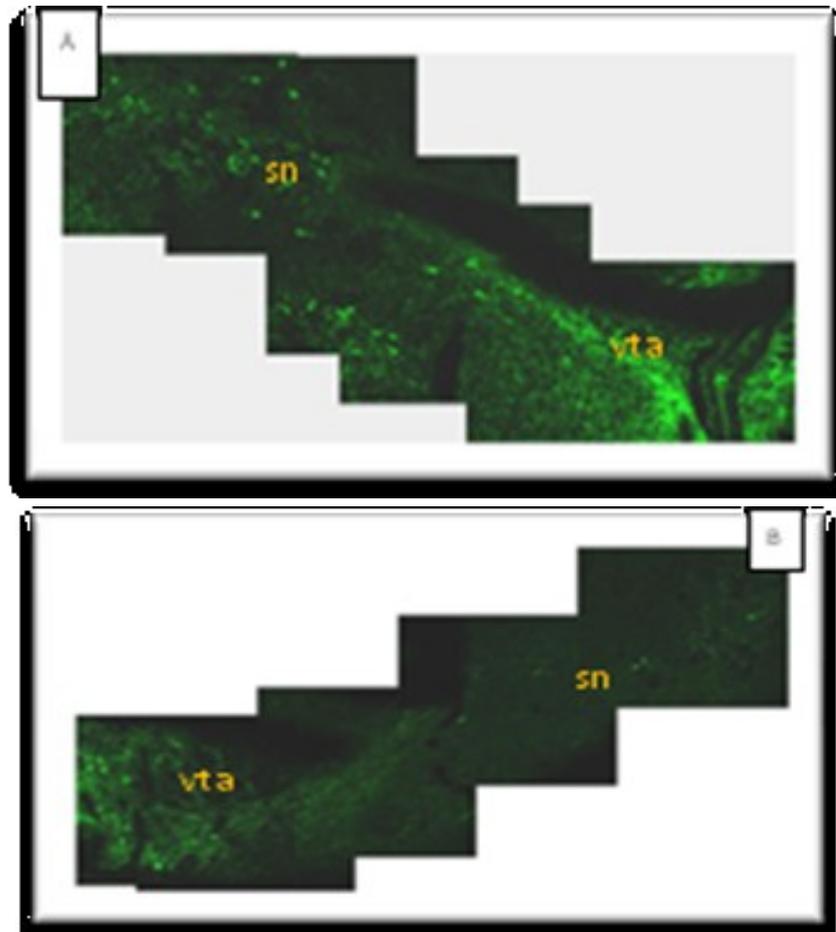


Figura 19: Efecto de la inyección unilateral de 1ug rot en el HMCA a 30 días post-lesión. Se observan las neuronas TH positivas en verde de un corte coronal, (coordenada -5,00 desde Bregma) correspondientes al área tegmental ventral (vta) y sustancia nigra (sn). A: SNpc del lado no lesionado y B: SNpc del lado lesionado. Microscopia confocal.

## 5) Inmunohistoquímica $\alpha$ -sinucleína

### 5.1) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti- $\alpha$ sinucleína

Para lograr determinar si el modelo de inyección de rot en el HMCA induce alteraciones en la  $\alpha$ -sin (2° objetivo específico plateado), comenzamos poniendo a punto el método de inmunohistoquímica para los anticuerpos disponibles. Utilizando el método clásico de inmunohistoquímica y luego de ensayar diferentes concentraciones de anticuerpo primario de  $\alpha$ -sin y distintos diluyentes, no logramos obtener una señal de reactividad que sugiriera especificidad. Por ello decidimos utilizar un protocolo de desenmascaramiento de anticuerpo, método muy utilizado para evidenciar agregados de proteínas y presencia de CL importantes para diagnóstico.

Se logró estandarizar el protocolo de inmunohistoquímica para la detección de la agregación de  $\alpha$ -sin, en donde previo a la incubación con el anticuerpo, se trató al tejido con ácido fórmico durante 1 minuto. Resultados preliminares muestran que en el tejido de los animales lesionados con 1ug de rot en el HMCA unilateral y evaluación del tejido 30 días post-lesión, existe una mayor señal de la proteína  $\alpha$ -sin que se co-localiza con la señal de la enzima TH, en comparación con los controles (Fig. 20 y 21).

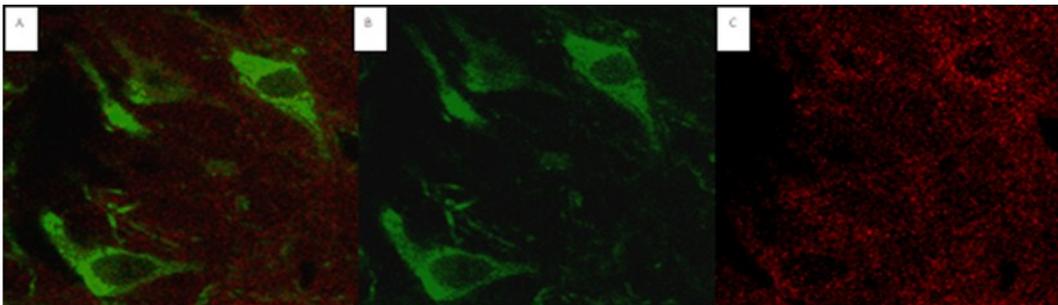


Figura 20: Imagen de un corte de la SNpc de un animal control. A: comarcado de neuronas TH positivas (verde) y neuronas  $\alpha$ -sinucleína positivas (rojo). B: neuronas TH positivas y C: neuronas  $\alpha$ -sinucleína positivas. Microscopia confocal.

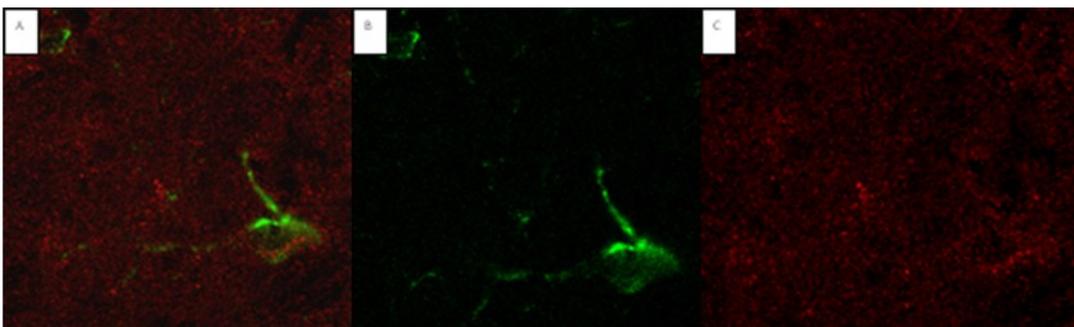


Figura 21: Imagen de un corte de la SNpc del lado lesionado (inyección unilateral de 1ug de rot en el HMCA, evaluación 30 días post-lesión) A: comarcado de neuronas TH positivas (verde) y neuronas  $\alpha$ -sinucleina positivas (rojo). B: neuronas TH positivas y C: neuronas  $\alpha$ -sinucleina positivas. Microscopia confocal.

## **5.2) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleina fosforilada**

Se realizaron inmunoensayos en los tejidos de los animales con lesión 1ug unilateral en el HMCA, 8 días post-lesión, y no se observaron diferencias significativas ya sea en el número o intensidad de señal de células  $\alpha$ -sinucleina-fosforilada positivas en los tejidos de los animales lesionados y los no lesionados, sin tratamiento de desenmascaramiento (Fig. 22 y 23).

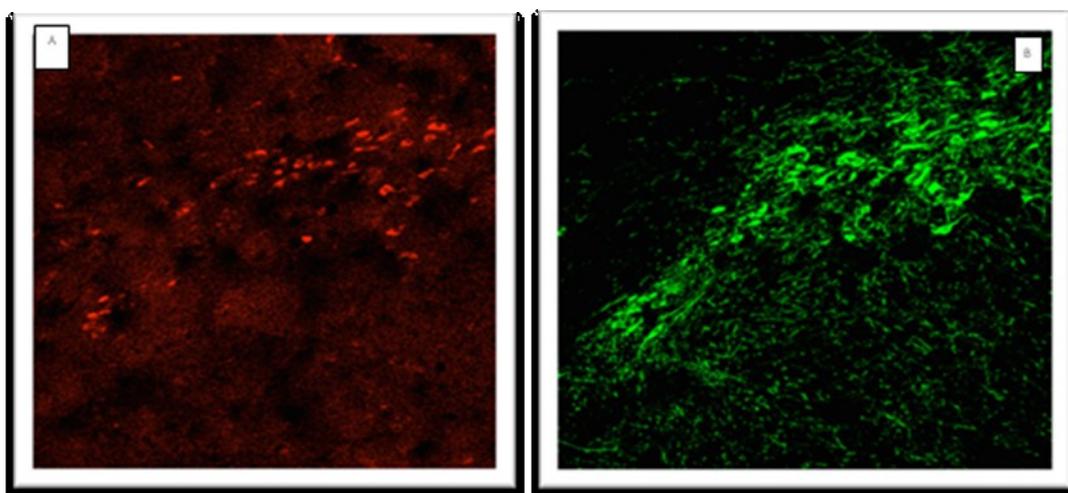


Figura 22: Efecto de la inyección unilateral de 1ug de rot en el HMCA, evaluación 8 días post-lesión. Imagen de un corte coronal de SNpc. A: Se observan las neuronas  $\alpha$ -sinucleina-fosforilada positivas (rojo) y B: neuronas TH positivas (verde). Microscopia confocal.

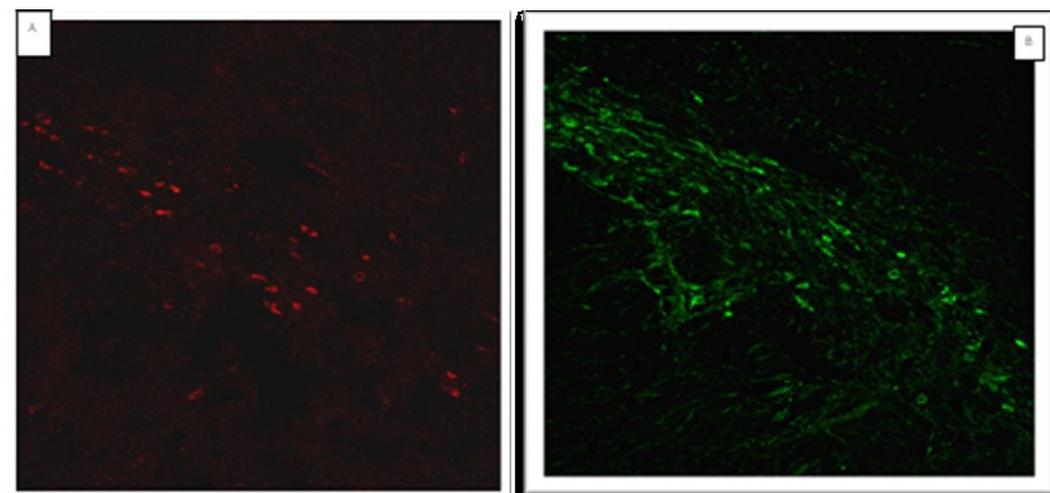


Figura 23: Imagen de un corte de la SNpc de un animal control. Se observan las neuronas  $\alpha$ -sinucleina-fosforilada positivas (rojo) y B: neuronas TH positivas (verde). Microscopia confocal.

## XII) Discusión

El objetivo del presente trabajo fue poner a punto un modelo de EP experimental en ratas utilizando rot como agente de daño. Esta toxina causa una lesión oxidativa y tiene la ventaja frente a otras toxinas utilizadas como la 6-OHDA y MPTP, que induce la formación de agregados de  $\alpha$ -sin tipo CL. Esto último ha llevado a plantear que los modelos de EP por rot reproducirían mejor la fisiopatología de la enfermedad.

Dado que este modelo se utilizará para evaluar posibles agentes neuroprotectores, nos planteamos obtener una degeneración progresiva y específica de aproximadamente el 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

Como primera aproximación, inyectamos unilateralmente rot en la SNpc a diferentes dosis y evaluamos sus efectos sobre los niveles de DA en el CE luego de 8 días. Los resultados mostraron una reducción de los niveles de DA dependiente de la dosis de rot. Con estos resultados se eligió la dosis de 12ug para los siguientes experimentos, debido a que causó una disminución del 40% de niveles de DA, reducción adecuada para procedimientos protectores.

Posteriormente se continuó trabajando con la dosis de 12ug inyectada en la SNpc y evaluamos los tejidos a los 8 días post-lesión. Se observó un 40% de DA y un 74% de proteína TH remanente en el CE del lado lesionado, lo que no se correspondió con el número de neuronas dopaminérgicas remanentes en la SNpc del lado lesionado (9,6%).

Estos resultados indican que existe un efecto de compensación por el sistema, a la falta de neuronas probablemente aumentando el metabolismo de las células remanentes, incrementando la producción y/o liberación de DA en los terminales provenientes de la SNpc y la VTA, así como también sucede con los niveles de la enzima TH. Cabe destacar que al inyectar la toxina en le SNpc no observamos daño a nivel de la VTA.

En la EP se sabe que estas respuestas compensatorias están activas en etapas tempranas de la enfermedad, cuando aún no se han hecho evidentes los síntomas motores. Algunos de estos mecanismos compensatorios implican el aumento en la liberación de DA y disminución de su re-captación, así como también el aumento de su tasa de recambio, en las neuronas remanentes. Debido a estas respuestas compensatorias del sistema frente a la lesión, es que los primeros síntomas del paciente se observan cuando el 80% de sus neuronas dopaminérgicas ya han muerto (9, 13 y 47).

La rot es una molécula lipofílica, por lo que es difícil solubilizar con agentes inocuos para las células. En este trabajo comenzamos utilizando DMSO como vehículo ya que estaba reportado en la literatura que en modelos similares no causaba lesión y redujimos al mínimo el volumen inyectado (1ul) para disminuir las probabilidades de daño. Aún así, en el grupo de animales, inyectados con DMSO se observó una disminución, aunque no significativa, de los niveles de DA en SNpc y CE, sugiriendo que el vehículo utilizado podría inducir algo de daño (aunque mucho menor que el causado por la toxina). Dado este resultados decidimos utilizar como vehículo DMSO/PGL (1:1) para los siguientes experimentos.

Al evaluar por inmunohistoquímica los tejidos de los animales con rot tanto 8 días como 30 días post lesión, se pudo ver a los distintos tiempos, el daño inespecífico observado es de similar dimensión. Esto estaría indicando que el daño causado con esta dosis de rot no se restringe a las células dopaminérgicas ni induce una evolución progresiva de la muerte celular, sino más bien causa una pérdida pronunciada de células en la SNpc.

Con el objetivo de evitar la lesión inespecífica se realizó una curva dosis-respuesta evaluando los niveles de DA remanentes, con menores dosis de rot inyectadas en la SNpc a los 30 días post lesión. Se observó una disminución de los niveles de DA dosis-dependiente, en donde existe un punto de inflexión en la dosis de 7ug. Al bajar la dosis de rot inyectada en la SNpc se observó que la muerte celular disminuye, pero el daño inespecífico (ausencia de tejido) no desaparece aún en la dosis más baja de 3ug.

Estos resultados sugieren que la inyección directa de rot en la SNpc podría ser un modelo adecuado para estudiar fenómenos plásticos compensatorios a nivel de los terminales dopaminérgicos en el CE. Sin embargo, causa una muerte celular rápida e inespecífica a nivel de la SNpc por lo que no es apropiado para estudiar mecanismos neuroprotectores. Por ello se modificó el lugar de inyección, pasando a inyectar en el HMCA. Como ya se describió, éste es un haz de axones de neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde el mesencéfalo hacia el CE.

La dosis de 1ug de rot inyectada en el HMCA mostró a los 8 días post-lesión un 30% de muerte de neuronas TH-positivas, que progresó a un 60% a los 30 días post-lesión. Estos resultados estarían evidenciando que en este modelo existe una progresión relativamente lenta de en la muerte neuronal. Además, en la SNpc de estos animales se observó la pérdida de neuronas

dopaminérgicas sin afectar aparentemente el tejido alrededor, sugiriendo especificidad de la lesión.

La inyección de Propilen Glicol (Pgl) en una proporción 1:1 con el DMSO en el HMCA disminuyó el daño inducido por la administración única de DMSO en la SNpc. Sin embargo, parece inducir cierta muerte de células TH-positivas, aunque menor que el daño causado por la toxina. A los 8 días no se observa diferencia significativa en el número de células, entre el vehículo y la toxina a las dosis de 1ug y 0,5ug inyectados en el HMCA probablemente porque la muerte celular generada por rot a este tiempo es baja.

Por otro lado a los 30 días post-lesión, se evidencia una diferencia significativa entre la disminución del número de células, generado por DMSO/PGL y la rot. Podemos ver que el daño causado por la rot a los 8 días, aumenta un 50% a los 30 días, sin embargo no fue así con el DMSO-PGL, donde el daño causado a los 8 días aumenta un 25% a los 30 días. El efecto del DMSO-PGL parecería ser desencadenado tempranamente, donde se establece y progresa muy lentamente.

Los resultados sugieren que el modelo de EP en rata por inyección de rot en el HMCA causa una degeneración progresiva de la vía nigro-estriatal, donde la administración focal de una pequeña dosis de rot tiene un efecto específico en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, prácticamente sin generar daño en los tejidos adyacentes.

Cabe mencionar que en este trabajo no se evaluó el efecto de la inyección de rot en el HMCA sobre las neuronas dopaminérgicas de la VTA. Es sabido que en el HMCA se encuentran tanto axones de la SNpc como de la VTA, por lo tanto deberían estar afectadas estas células también. Sin embargo, algunos trabajos en modelos de EP de inyección unilateral de pequeñas dosis de rot en el HMCA establecen que no se evidencia un daño en las células de la VTA (27). Otros trabajos donde se inyectaron altas dosis de rot en el HMCA, han reportado pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la VTA (44).

La literatura indica que la muerte de las células dopaminérgicas de la SNpc al inyectar bajas dosis de rot en el HMCA se debe a un aumento del estrés oxidativo en estas neuronas, evidenciado por la co-localización de la inmunoreactividad de TH con SOD2 (señal celular del estrés oxidativo). A los 60 días post-lesión, las células TH positivas presentan inmunoreactividad para SOD2 y G3BP (Ras-GAP SH3 dominio de unión a proteína, marcador de

estrés celular) sugiriendo que bajas dosis de rot en el HMCA induce estrés oxidativo crónico en las células dopaminérgicas (27).

Una alta dosis de rot inyectada directamente en la SNpc también genera radicales libres y afecta los niveles de GSH (señal de aumento de estrés oxidativo) (36). Por lo tanto con ambas dosis (alta y baja) existe un aumento del estrés oxidativo, aunque probablemente en el segundo caso los niveles de estrés oxidativos alcanzados sean mayores y por lo tanto los mecanismos de muerte celular sean diferentes, siendo de tipo apoptótico para las dosis bajas y de tipo necrótico para las dosis altas de la toxina.

Varios estudios han reportado que el grado de degeneración es mayor en las terminales dopaminérgicas estriatales que en los cuerpos neuronales de la SNpc de pacientes con EP, incluso en etapas tempranas de la enfermedad. Esto ha llevado a proponer que la muerte de neuronas dopaminérgicas es una degeneración por muerte retrógrada (35). En este sentido el modelo de inyección en el HMCA, sería un modelo de estas características, en donde la muerte comienza por el axón de la neurona y sería otra característica ventajosa del modelo

Como se mencionó anteriormente, la rot afecta la fosforilación oxidativa inhibiendo el Complejo I mitocondrial, generando la reducción de la actividad de la enzima NADH reductasa. Como resultado de esto, el potencial de membrana mitocondrial y la síntesis de ATP, colapsan. La reducción de la generación de ATP podría luego inhibir las vías citoprotectoras dependientes de ATP, como es la vía proteosomal, actividad chaperona y bombas de calcio que regulan los niveles de calcio celular. Esto podría llevar a la generación de agregados de la proteína  $\alpha$ -sin como consecuencia de la falla de distintas vías, que se dan con esta toxina y no con otras como 6-OHDA y MPTP. La bibliografía consultada, reporta modificaciones covalentes en esta proteína en EP, como la nitración en residuos de tirosina y fosforilación en la Ser129, que bloquean la conversión de oligómeros en fibrillas (53 y 55). Así, un aumento de la fosforilación de  $\alpha$ -sin, estaría relacionada con un aumento en la toxicidad en la célula, ya que se mantiene la forma oligomérica de la proteína la cual se cree que es la conformación más tóxica. Contrario a lo esperado, nuestros resultados no evidenciaron diferencias en la fosforilación de la  $\alpha$ -sin en los animales lesionados y no lesionados luego de la inyección de 1  $\mu$ g de rot en el HMCA a los 8 días post-lesión. Sin embargo, no realizamos estudios a tiempos posteriores con el modelo de inyección de la toxina en el HMCA, donde de acuerdo a la bibliografía publicada sería más probable encontrar alteraciones en esta proteína.

En cuanto a la presencia de agregados de  $\alpha$ -sin celulares, hemos puesto a punto la metodología para detectarlos. Resultados preliminares muestran en el modelo de inyección unilateral de 1ug de rot y evaluación 30 días post-lesión, que los tejidos de los animales lesionados parecerían tener mayor señal de la proteína  $\alpha$ -sin que se co-localiza con las células TH-positivas, en comparación a los controles. Resta por confirmar si luego de la lesión con rot en el HMCA y evaluación a los 30 días se generan agregados  $\alpha$ -sin y si la forma fosforilada de esta proteína está aumentada.

### XIII) Conclusiones

- La inyección de rot directamente en la SNpc causa una muerte celular rápida e inespecífica en el lugar de administración de la toxina, por lo que no parece un modelo apropiado para estudiar mecanismos neuroprotectores. Sin embargo, la relativa preservación del metabolismo dopaminérgico a nivel del estriado sugieren que este modelo podría ser adecuado para estudiar fenómenos plásticos compensatorios a nivel de los terminales dopaminérgicos.
- La inyección de rot en el HMCA provoca una degeneración progresiva y selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc, lo que lo hace un modelo apropiado para el estudio de posibles terapias neuroprotectoras.
- Resultados preliminares mostraron que la rot induce la agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína.
- La inyección de rot no parecería tener efecto en la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína a los tiempos estudiados. Por otro lado nuestros resultados mostraron que en los animales controles existe una activa fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína.

### XVIII) Perspectivas

El modelo de la inyección de 1ug de rot en el HMCA y evaluación 30 días post-lesión provoca una degeneración progresiva y selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc y probablemente la agregación de la proteína  $\alpha$ -sin. Estas características sugieren que podría ser un buen modelo para el estudio de posibles agentes neuroprotectores y sus mecanismos subyacentes. En este sentido es importante continuar con la caracterización del modelo, y se llevará a cabo de la siguiente manera:

- \*evaluar los niveles de DA y TH en el CE.
- \*confirmar la presencia de agregados de proteína  $\alpha$ -sin y determinar si hay un incremento de la fosforilación de esta proteína a 30 días post-lesión.
- \*determinar los niveles de radicales libres a través de la técnica de Diclorofluoresceína en la SNpc de los animales lesionados.
- \*evaluar comportamentalmente las disfunciones motoras que la lesión desencadena en estos animales (como por ejemplo: test footprint y giro inducido por amfetamina)

Estos estudios permitirán una más amplia caracterización de este modelo de EP experimental, para luego ser utilizado para la evaluación de posibles agentes protectores/beneficiosos, como el agonismo nicotínico. También podrá ser empleado para el estudio de los mecanismos subyacentes al daño neuronal para identificar posibles blancos para encontrar terapias efectivas para esta enfermedad.

## XV) Referencias

- 1) Abin-Carriquiry J.A, Mcgregor-Armas R, Costa G, Urbanavicius J and Dajas F. Presynaptic Involvement in the Nicotine Prevention of the Dopamine Loss Provoked by 6-OHDA Administration in the Substantia Nigra. *Neurotoxicity Research*. 4:133-139, 2002.
- 2) Abin-Carriquiry JA, Costa G, Urbanavicius J, Cassels BK, Rebolledo-Fuentes M, Wonnacott S, Dajas F. In vivo modulation of dopaminergic nigrostriatal pathways by cytosine derivatives: implications for Parkinson's Disease.. *Eur J Pharmacol*.1-3:80-84, 2008.
- 3) Antony P, Diederich N and Balling R. Parkinson's disease mouse models in translational research. *Mamm Genome* (2011) 22:401–419. DOI 10.1007/s00335-011-9330-x
- 4) Betarbet, R. et al. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3, 1301–1306
- 5) Bezard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalon S, Guilloteau D, Crossman AR, Bioulac B, Brotchie JM, Gross CE (2001a) Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:6853–6861.
- 6) Blum D., Torch S., Lambeng N. (2001) *Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease*. *Progress in Neurobiology*. 65: 135-172.
- 7) Bové J and Perier C. Neurotoxin-Based Models of Parkinson's Disease *Neuroscience* 211 (2012) 51–76.
- 8) Bové J, Prou D, Perier C and Przedborski S. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc.* 2: 484-494, 2005 2
- 9) Chang J., Wachtel D, Young D and Kang .U (1999) *Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions*. *Neuroscience* 88: 617-628.
- 10) Chung KK, Thomas B, Li X, Plethikova O, Troncoso J, Marsh J, Dawson V and Dawson T. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* 2004;304:1328–1331. [PubMed: 15105460]
- 11) Cookson M.  $\alpha$ -Synuclein and neuronal cell death. *Molecular Neurodegeneration* 2009, 4:9 doi:10.1186/1750-1326-4-9
- 12) Costa G, Abin-Carriquiry J.A and Dajas F. Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesions in the substantia nigra. *Brain Res*. 888:336-342, 2001.
- 13) Deumens R., Blokland A. and Prickaerts J. (2002) *Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway*. *Science*.14: 4886-4902.
- 14) Deumens R., Blokland A. and Prickaerts J. (2002) *Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway*. Elsevier *Science*.14: 4886-4902.
- 15) Facecchia K, Fochesato L, Ray S, Stohs S and Pandey S. Oxidative Toxicity in Neurodegenerative Diseases: Role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies. *Journal of Toxicology* vol. 2011, Article ID 683728, 12 pages. doi: 10.1155/2011/683728.

- 16) Feldman R., Meyer J. (1997) Catecholamines (cap 8), en Feldman R. *Principes of Neuropsychopharmacology*. (277-343) Sunderland: Sinauer Associates, Inc
- 17) Francesca Cicchetti, Janelle Drouin-Ouellet and Robert E. Gross Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends in Pharmacological Sciences* Vol.30 No.9 doi:10.1016/j.tips.2009.06.005
- 18) Jellinger K.A. Formation and development of Lewy pathology: a critical update. *J Neurol*. 256: S270-S279
- 19) Jenner, P. Current Concepts on the Etiology and Pathogenesis of Parkinson Disease. In: Fahn, S.;Jankovic, J., editors. *Principles and Practice of Movement Disorders*: Churchill Livingstone. 2007.p. 672
- 20)Kandel E.R, Schwartz J.H and Jessell T.M. *Principios de Neurociencias*. 4ta Edición. Editorial: Mcgraw Hill 862-864 Capítulo 43: "Los ganglios basales".
- 21) Keane P, Kurzawa M, Blain P and Morris C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* vol. 2011, Article ID 716871, 18 pages. doi: 10.4061/2011/716871.
- 22) Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci*. 10;26(19):5256-64. 2006
- 23) Kordower J, Chu Y, Hauser R, Freeman R and Olanow W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine* Vol 5 2008; doi:10.1038/nm1747
- 24) Levy O, Malagelada C, and Greene L. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*. 2009 April ; 14(4): 478-500. doi:10.1007/s10495-008-0309-3. NIH Public Access.
- 25) Lindemann C, Krauss K and Schwabel K. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease: Effects on sensorimotor gating. *Behav Brain Res* (2012), doi:10.1016/j.bbr.2012.02.009
- 26) McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001;297:191-194. [PubMed: 11137760]
- 27) Norazit .A, Meedeniya .A, Nga Nguyen M. and Mackay-Sim .A. Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. *Brain Research* 1360 (2010) 119-129.
- 28) Obeso J. A. and Lanciego J. L. Past, present and future of the pathophysiological model of the basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy*. (2011). doi: 10.3389/fnana. 2011.00039
- 29) Olanow, C.W. (2007) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 22 (Suppl 17), S335-342
- 30) Paxinos G. and Watson G. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2<sup>a</sup> ed. Australia: Academic Press.
- 31) Peter Redgrave y cols. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. 2011
- 32) Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini A, Jakowec M, Petzinger G, Miller R and Akram M. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *Journal of Neurochemistry*,(2001), 76, 1265±1274.

- 33) Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, Lamantia A, Mcnamara J y Williams S. Neurociencia. Capítulo 17: Modulación del movimiento por los ganglios basales. 3era ed. Editorial Médica: Panamericana
- 34) Ravenstijn G.M., Merlini M, Hameetman .M, Murray T.K., Ward M. A, Lewis .H, Ball .G, Mottart. C, Ville de Goyet .Ch, Lemarchand .T, van Belle . K, O’Nell .M, Danhof .M and Lange .E. The exploration of rotenone as a toxin for inducing Parkinson’s disease in rats, for application in BBB transport and PK-PD experiments. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 57 (2008) 114-130
- 35) Robert E. Burke and O’Malley K. Axon degeneration in Parkinson’s disease. *Experimental Neurology* (2012), doi: 10.1016/j.expneurol.2012.01.011
- 36) Saravanan K, Sindhu K and Mohanakumar K., 2005. Acute intranigral infusion of rotenone in rats causes progressive biochemical lesions in the striatum similar to Parkinson's disease. *Brain Research*. 1049, 147–155.
- 37) Schapira AH (2006) Etiology of Parkinson’s disease. *Neurology* 66:S10–S23
- 38) Schapira AH and Tolosa E (2010) Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment. *Nat Rev Neurol* 6:309–317.
- 39) Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Krige D, Jenner PJ, Marsden CD. Mitochondrial function in Parkinson’s disease. The Royal Kings and Queens Parkinson’s Disease Research Group. *Ann Neurol* 1992;32(Suppl):S116–124. [PubMed: 1510369]
- 40) Sherer T.B, Richardson J.R, Testa C.M, Sea B.B, Panov A.V, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Miller G. W and Greenamyre J.T. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson’s disease. *Journal of Neurochemistry*. 100: 1469-1479, 2007.
- 41) Siegel G; Albers W; Btady S (2006). Capítulo: 12 “Catecholamines” *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7a edición). Elsevier Academic Press: London UK
- 42) Siegel G; Albers W; Btady S (2006). Capítulo: 46 “Neurotransmitters and Disorders of Basal Ganglia” *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7a edición). Elsevier Academic Press: London UK
- 43) Siegel G; Albers W; Btady S (2006). Capítulo: 45 “Neurodegenerative  $\alpha$ -Synucleinopathies and Tauopathies” *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7a edición). Elsevier Academic Press: London UK
- 44) Sindhu, K.M., Saravanan, K.S., Mohanakumar, K.P., 2005. Behavioral differences in a rotenone-induced hemiparkinsonian rat model developed following intranigral or median forebrain bundle infusion. *Brain Research*. 1051, 25–34.
- 45) Singh N., Pillay V. (2007) *Advances in the treatment of Parkinson’s disease*. Progress in Neurobiology. 81: 29-44.
- 46) Snyder .L, Kirkland .J and Glajch .J Practical HPLC method development. 2<sup>nd</sup> ed. Jhon Wiley and Sons, INC. 1997.
- 47) Song D. and Haber S. (2000) *Striatal responses to partial dopaminergic lesion: Evidence for compensatory Sprouting*. The Journal of Neuroscience. 20: 5102-5114.
- 48) Tadaiesky M., Dombrowski P., Figueiredo C, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, and Takahashi R. (2008) *Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson’s disease*. *Neuroscience* 156: 830-840

- 49) Terzioglu, M., Galter, D., 2008. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. *FEBS J.* 275, 1384–1391
- 50) Todd B. Sherer, Richardson J, Testa C, Seo B, Panov A, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Miller G and Greenamyre J. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 2007, 100, 1469-1479.
- 51) Tsang A and Chung K. Oxidative and nitrosidative stresses in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, 643-650
- 52) Urbanavicius J, Ferreira M, Costa G, Abin-Carriquiry J.A, Wonnacott S and Dajas F. Nicotine induces tyrosine hydroxylase plasticity in the neurodegenerating striatum. *J. Neurochem* 102:723-730, 2007
- 53). Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry* 2007;103:17–37. [PubMed: 17623039]
- 54) Varsha S, Santosh M y Harish P. Oxidative stress in neurodegeneration. *Advances in pharmacological sciences*. 2011 572634 doi: 10.1155/2011/572634
- 55) Wakamatsu M. Accumulation of Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein in Dopaminergic Neurons of Transgenic mice That Express Human  $\alpha$ -Synuclein. *Journal of Neuroscience*. 85: 1819-1825. 2007
- 56) Wang, X.F. et al. (2006) Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 23, 198–205
- 57) Xu J, Kao S-Y, Lee FJS, Song W, Jin L-W, Yankner BA. Dopamine-dependent neurotoxicity of [alpha]-synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* 2002;8:600–606. [PubMed: 12042811]

