

Efecto de la pérdida de la inervación dopaminérgica del núcleo subtalámico sobre la conducta motora de ratas

Nancy Pavón-Fuentes,* Lisette Blanco-Lezcano, Lourdes Lorigados-Pedre, Lázaro Álvarez-González, Lisis Martínez-Martí y Raúl Macías-González.

Centro Internacional de Restauración Neurológica, Avenida. 25 No. 15805 entre 158 y 160, Ciudad de La Habana, Cuba. Código Postal: 11300.

Recibido: 26 de mayo de 2009.

Aceptado: 13 de octubre de 2009.

Palabras clave: enfermedad de Parkinson, núcleo subtalámico, ratas parkinsonianas, dopamina, D-anfetamina.
Key words: Parkinson's disease, subthalamic nucleus, hemiparkinsoniam rats, dopamine, D-amphetamine.

RESUMEN. Actualmente la enfermedad de Parkinson es considerada como un trastorno del sistema nervioso central que afecta a los ganglios basales. Las características anatomopatológicas más prominentes de esta enfermedad son: degeneración de las células dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNc), la existencia de gliosis y la presencia de cuerpos eosinófilos de inclusión. La relevancia fisiológica de la modulación directa de las neuronas del núcleo subtalámico (NST) por neuronas dopaminérgicas de la SNc deviene en un tema polémico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas que inervan al NST sobre la conducta motora de ratas sanas. Se trabajó con tres grupos experimentales: I: con lesión de la SNc por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (n = 20); II: con pérdida de la inervación dopaminérgica del núcleo subtalámico por inyección de 6-OHDA en dicho núcleo (n = 30) y III: control (n = 20). Un mes después de haber inyectado la neurotoxina, fue evaluada la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina y apomorfina y las habilidades motoras de extremidades anteriores. Los estudios conductuales y morfológicos evidenciaron que la inyección de 6-OHDA en el NST, induce una pérdida parcial de neuronas en la SNc, en el hemisferio lesionado. La pérdida de la inervación dopaminérgica del NST provoca una asimetría en la conducta motora de los animales que se traduce en un peor desempeño en las habilidades de la extremidad anterior y una conducta motora rotacional intensa, ipsilateral al hemisferio lesionado como consecuencia de la administración de D-anfetamina.

ABSTRACT. At present Parkinson's disease is considered as a dysfunction of the central nervous system that affects the basal ganglia. The more prominent anatomopathologic characteristic of this illness is: the degeneration of the dopaminergic cells of the *substantia nigra pars compacta* (SNc), gliosis and the eosinophilic inclusion bodies. The physiologic relevance of the direct modulation of the neurons of the subthalamic nucleus (STN) by dopaminergic neurons of SNc becomes a polemic topic. The main objective of this work was to evaluate the effect of the selective lesion of the dopaminergic neurons that innervate the STN on the motor behavior. The animals were divided in three experimental groups: I: with 6-OHDA lesion of SNc (n = 20); II: with loss of the dopaminergic innervations of the STN for injection of 6-OHDA in this nucleus (n = 30) and III: healthy animal (n = 20). One month after having injected the neurotoxin, the rotational activity induced by D-amphetamine and apomorfine and the changes in skilled forelimb use were evaluated. The behavioral and morphological studies evidenced that the injection of 6-OHDA in NST, induces a partial loss of neurons in SNc, in the injured hemisphere. The loss of the dopaminergic innervations of STN provokes an asymmetry in the motor behavior of the animals that provoke a worse acting in the skilled forelimb use and an increase in their rotating behaviour, ipsilateral to the injured hemisphere induced by injection.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza clínicamente por temblor durante el reposo, rigidez muscular, disminución en la cantidad de movimientos voluntarios (hipocinesia), así como reducción de la velocidad y amplitud de estos (bradicinesia).^{1,2} Las características anatomopatológicas más prominentes de esta enfermedad son la degeneración de las células dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNc), la existencia de gliosis y la presencia de cuerpos eosinófilos de inclusión en el citoplasma de las neuronas de la SNc y *locus coeruleus* principalmente.³

Actualmente, la EP es considerada como un trastorno que afecta a los ganglios basales (GB), término acuñado por el uso para referirse a los núcleos grises de la base del encéfalo.⁴ Estos núcleos forman una unidad compleja que tiene múltiples conexiones aferentes y eferentes con regiones de la corteza cerebral, cerebelo, tálamo motor y varias estructuras subcorticales.⁵ Funcionalmente, los GB mantienen segregadas las distintas modalidades sensoriales que procesan y poseen una organización somatotópica en los componentes sensorimotora.⁵ Se han descrito cinco circuitos "corteza - ganglios basales - tálamo - corteza", que representan una vía a través de la cual la

información proveniente de áreas específicas de corteza es retornada a algunas de estas mismas áreas después de un procesamiento intermedio entre los GB y el tálamo. Estos circuitos funcionan en paralelo y desempeñan un importante papel en las funciones esqueleto-motoras, oculomotoras, cognitivas y límbicas.^{3,6-8} La organización funcional del circuito motor es muy relevante para el tratamiento neuroquirúrgico de la EP y otros trastornos del movimiento. Según el modelo actual, dentro de los ganglios basales el circuito motor está dividido en dos sistemas de proyección estriopálidas (vías “directa” e “indirecta”) con origen en diferentes subpoblaciones de neuronas estriatales y terminación en los núcleos de salida (Globo pálido medial (GPM) y *substantia nigra pars reticulata* (SNr)) a través de diferentes rutas.⁹ Los grupos neuronales de origen de cada una de las vías son relativamente independientes y se diferencian por el neuromodulador que poseen (sustancia P/dinorfina o encefalina) y por el tipo de receptor dopaminérgico (D1 o D2) que predominantemente expresan.^{3,9,10} Áreas específicas del GPM y la SNr, que reciben aferencias provenientes de las áreas motoras: del putamen, de la porción lateral del globo pálido (GPI) y del núcleo subtalámico (NST), constituyen los componentes de salida del circuito motor de los GB, cuyas proyecciones gabaérgicas ejercen un efecto tónico inhibitorio, sobre sus núcleos diana en el tálamo y el tronco encefálico.¹¹ Esta organización constituye el sustrato neuronal del procesamiento en paralelo de diferentes funciones.

La dopamina ejerce un efecto dual sobre las neuronas estriatales (excitador sobre la vía directa e inhibitorio sobre la indirecta).¹² Esto ha conducido, a numerosos autores, a adjudicarle una función tónica sobre las dos vías de los ganglios basales, mientras mantiene inhibidos sus núcleos de salida (GPM y SNr) y facilitando permanentemente la ejecución de planes motores corticales.^{12,13} La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc conduce a una disminución en la concentración de dopamina (DA) en el estriado, que afecta más al núcleo putamen que al caudado.^{5,14} Sin embargo, aunque el estriado, es el principal blanco fisiológico de la innervación dopaminérgica del cerebro medio el GPI, GPM, la SNr y el NST también reciben aferencias dopaminérgicas significativas a partir de las neuronas de la SNc.

El descubrimiento de la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) específica para células catecolaminérgicas ha tenido una significativa trascendencia en los avances obtenidos en estos tiempos en la experimentación animal relacionada con la EP. La lesión unilateral de la SNc en animales de experimentación (ratas y ratones), mediante la inyección intracerebral de 6-OHDA, provoca severas afecciones conductuales, como consecuencia de la destrucción casi completa de los cuerpos neuronales de este núcleo, junto con la disminución de la DA estriatal. Este paradigma experimental es ampliamente utilizado, pues conduce al desarrollo de disfunciones motoras neurológicas asimétricas, en el hemisferio contralateral al hemisferio lesionado dando lugar a ratas hemiparkinsonianas.¹⁵⁻¹⁷

El NST tiene un papel importante en el control motor y es crucial en los síntomas y signos que acompañan a la EP. No obstante, la relevancia fisiológica de la pérdida de la modulación directa de las neuronas del NST por neuronas dopaminérgicas de la SNc deviene en un tema polémico, debido al pequeño calibre y baja densidad de los axones dopaminérgicos encontrados en este núcleo.¹⁸ El NST al igual que el cuerpo estriado, recibe aferencias excitadoras glutamatérgicas, directas

y monosinápticas de la corteza ipsilateral, y conexiones contralaterales de tipo oligosinápticas, topográficamente organizadas.¹⁹ Estas aferencias proceden de las áreas precentral, premotora y prefrontal, así como del área motora suplementaria y terminan en la región central y lateral del núcleo.¹⁰ Además, el NST recibe aferencias provenientes fundamentalmente del GPI, del tálamo y del núcleo pedúnculo-pontino (NPP).^{4,20,21} Por último, se ha descrito, tanto en monos como en ratas, la presencia de aferencias dopaminérgicas al NST provenientes de la SNc.²² Por otro lado, la principal eferencia del NST se dirige hacia el GPM.²³⁻²⁵ Varios autores indican que esta proyección, en la rata, emite colaterales hacia SNr (proyecciones subtálamo-nígricas), mientras que en primates parece que existen diferentes poblaciones celulares que inervan al GPM y a la SNr.^{22,24, 26}

Para la comprensión de que el NST puede contribuir en la neurodegeneración presente en los ganglios basales en la EP y que la restauración de la innervación dopaminérgica a esta estructura puede resultar en una mejoría importante de los síntomas y signos de dicha enfermedad o de las alteraciones conductuales presentes en modelos experimentales de parkinsonismo, es esencial el conocimiento de la existencia de una proyección dopaminérgica entre la SNc y el NST y una proyección recíproca glutamatérgica entre el NST y la SNc. El objetivo principal de este trabajo estuvo dirigido a evaluar el impacto sobre la conducta motora de la pérdida selectiva de la innervación dopaminérgica del NST, conservando la innervación del estriado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos experimentales

Se utilizaron ratas machos adultos Wistar, con pesos entre 200 y 250 g al comienzo del experimento, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Ciudad de La Habana, Cuba. Los animales fueron mantenidos, en cajas plásticas translúcidas a una temperatura media de 23 °C (22 ± 2) °C, con suministro de alimentos y agua *ad libitum* y períodos de luz y oscuridad de 12 h. Las ratas fueron mantenidas en grupos de cinco por caja.

Lesión con 6-OHDA

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral [0,42 g/kg de peso, ip., Merck (Darmstadt, Alemania)] y colocadas en un marco diseñado para cirugía estereotáctica (David Kopf Instruments, EE. UU.). Los animales fueron divididos en tres grupos experimentales: I: Ratas con lesión completa de la SNc por inyección unilateral de 6-OHDA en dicha estructura (n = 20); II: Ratas con pérdida de la innervación dopaminérgica del núcleo subtalámico por inyección unilateral de 6-OHDA en dicho núcleo (n = 30) y III: Ratas sanas (n = 20).

La SNc fue lesionada unilateralmente (hemisferio derecho) por inyección estereotáctica de la neurotoxina catecolaminérgica 6-OHDA-HBr (8 µg/3 µL de disolución salina, la cual contenía además 0,2 mg/mL de ácido ascórbico) dentro del hemisferio derecho (coordenadas: AP: -4,4 mm, L: +1,2 mm, V: -7,8 mm de la dura, barra incisiva 2,4 mm por debajo de la línea interaural).

Con el fin de proceder a la denervación selectiva de las fibras dopaminérgicas que inervan al NST se inyectaron 3 µL de la neurotoxina 6-OHDA-HBr, dentro del núcleo subtalámico derecho. Las coordenadas fueron calculadas tomando como punto de referencia Bregma acorde con el atlas de Paxinos y Watson (coordenadas: AP: -3,8 mm, L: +2,2 mm, V: -8,1 mm de la Dura, barra

incisiva 2,4 mm por debajo de la línea interaural).²⁷ Una vez en el lugar, la neurotoxina fue inyectada lentamente, a una velocidad de flujo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, con una jeringuilla Hamilton (5 μL), que se mantuvo *in situ* cinco min después de finalizada la inyección.

Criterios de exclusión

Fueron excluidos del experimento aquellos sujetos pertenecientes a cualesquiera de los grupos experimentales que mostraron en cualquier momento infecciones severas, lesiones en los ojos que les dificulten la visión o atrofia marcada de alguna extremidad aislada (uno por lesiones en los ojos).

Evaluaciones conductuales

Conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos

La actividad rotatoria inducida por D-anfetamina [5 mg/kg de peso (ip.), Sigma, (St. Luis, MO, EE. UU.)] y por apomorfina [0,05 mg/kg de peso (sc.), Sigma, (St. Luis, MO, EE. UU.)] fue evaluada para medir el grado de la lesión.

Las ratas fueron colocadas en los tanques de rotación después de la inyección con los agonistas dopaminérgicos mencionados y tuvieron cinco min de habituación antes de comenzar a registrar las rotaciones. La evaluación de la efectividad de la lesión fue realizada un mes después de inyectar la neurotoxina.

El número de vueltas completas (360°) que dieron los animales fue registrada en un Rotómetro electrónico (ROTORCID, ICID, Cuba) que cuantifica automáticamente los giros que realiza el animal hacia la derecha o izquierda o ambas durante 90 min, después de la inyección con D-anfetamina y en 45 min, después de la inyección con la apomorfina. Todas las mediciones conductuales fueron llevadas a cabo entre las 9:00 y las 15:00 horas, en habitaciones con luz artificial y aislada de ruido ambiental. Se dejaron transcurrir siete días entre la evaluación con D-anfetamina y con apomorfina.

Habilidades motoras de las extremidades anteriores

En todas las ratas fueron evaluadas las habilidades motoras de las extremidades anteriores. Para ello se utilizó la prueba de habilidad manual.^{15, 28}

Caja experimental. En la evaluación de la conducta sensorimotora en los animales de experimentación, se emplearon cajas de acrílico rojo (3 mm de espesor) de 28 cm de largo (Fig. 1); 6,6 cm de ancho y 6,8 cm de altura (fabricadas en el Taller de Prototipo, Centro Internacional de Restauración Neurológica). Aproximadamente los dos tercios anteriores de la caja, están ocupados por una plataforma central de 4,7 cm de alto y 2,9 cm de ancho, con espacios a ambos lados para insertar una escalerilla móvil de seis escalones en cada uno de los extremos. Cada escalón y el nivel inferior (piso de la caja) poseen una pequeña concavidad, donde se sitúan dos trozos de alimento (*pellets*) con sabor diferente al que normalmente ingieren, por lo cual el animal dispone de catorce *pellets* a cada lado. La plataforma central impide que el animal alcance el alimento de un lado con la extremidad contraria. La base del extremo posterior de la caja posee una abertura que posibilita el acceso de la rata al compartimiento interior (Fig. 1).

Seis días antes de la realización de la prueba las ratas se sometieron a un régimen de alimentación restringida (10 a 12 g de alimento diario por animal). Tres días después de comenzado este, los animales se colocaron

dentro de las cajas experimentales una vez por día durante 15 min; con el propósito de que se familiarizaran con las condiciones experimentales.

Una vez comenzadas las sesiones experimentales, las ratas se introdujeron en las cajas de prueba, una vez al día, durante 15 min, por seis días consecutivos. Al final de cada sesión, se retiraron las escaleras de las cajas experimentales y se contabilizaron los trozos de alimentos que no fueron comidos, de cada lado (derecho e izquierdo) de manera independiente.

Evaluación de células inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa. Al culminar la evaluación conductual los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (0,42 g/kg ip.) y los cerebros perfundidos por inyección transcardiaca con 500 mL de una disolución de lavado (cloruro de sodio al 0,9 %) y 500 mL de una disolución fijadora que contenía paraformaldehído al 4 %. Las muestras fueron congeladas hasta su utilización.

Se obtuvieron secciones histológicas de 20 μm de grosor, por cortes con el criostato (Leitz-1780, Alemania), del área de la *substantia nigra* a temperatura de corte de -20°C . Las secciones histológicas fueron colocadas en láminas portaobjetos previamente recubiertas con gelatina-alumbre de cromo.

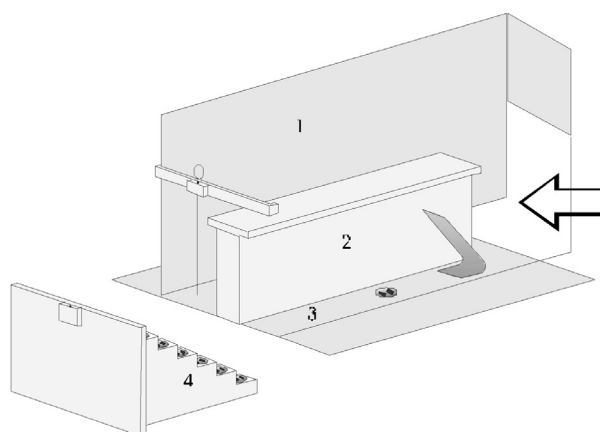


Fig. 1. Representación esquemática de la caja empleada para la realización de la prueba de habilidades manuales.

1. Caja de acrílico rojo. 2. Plataforma central. 3. Espacio a ambos lados para insertar la escalerilla móvil. 4. Escalerilla móvil provista de una pequeña concavidad en cada escalón y en el piso de la caja donde se sitúan dos trozos de alimentos.

Procesamiento inmunohistoquímico para la visualización de las células inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa.

Las láminas con las secciones histológicas fueron lavadas en disolución tampón de fosfato tres veces durante 10 min cada vez. Se incubaron durante 20 min con una disolución que contenía 20 % de suero fetal de ternera (SFT) y 0,25 % de Tritón X-100 diluidos en disolución reguladora de fosfato. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche, en cámara húmeda a 4°C , con el anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa, (Böehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) diluido 1 : 100 en STF que contenía 1 % de SFT y 0,125 % de Tritón X-100. Las láminas fueron incubadas con el anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado durante 1 h (1 : 500, diluido en STF que contenía SFT 1 % y Triton X-100 0,25 %). Para amplificar la reacción las secciones fueron incubadas con

el Complejo Streptavidina-peroxidasa-biotina (Dako, Dinamarca) a una dilución de trabajo de 1 : 100, durante 1 h . Después de todas las incubaciones, las muestras fueron lavadas tres veces en STF durante 10 min . En el revelado se utilizó una disolución que contenía peróxido de hidrógeno como sustrato y la diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) como cromógeno. La reacción se detuvo con agua corriente durante cinco min (una vez que se obtuvo la intensidad de coloración deseada) y luego los cortes fueron lavados con agua destilada. Finalmente, las láminas se deshidrataron utilizando una serie de alcoholes de concentraciones crecientes (70, 80, 90, 95 y 100 %) y aclaradas en xilol. Como medio de montaje se utilizó el DPX (Sigma-Aldrich, EE. UU.).

Procesamiento estadístico

Con vistas a precisar de manera general el comportamiento de los grupos en las diferentes evaluaciones se realizó estadística descriptiva y se procesó toda la información recogida mediante el paquete de programas Statistica para Windows. Versión 6.0, 1996.

Se verificó la distribución normal mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,1$) y la homogeneidad de varianza por la prueba de Levene. Los datos obtenidos de la evaluación de las habilidades motoras de las extremidades anteriores fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación doble con mediciones repetidas. En estos casos, los factores tenidos en cuenta fueron: grupo y tiempo. Las diferencias entre los grupos se establecieron con la prueba de comparación múltiple Newman-Keuls. Para el estudio comparativo de la actividad rotatoria inducida por drogas entre grupos experimentales, se realizó análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal-Wallis, seguido de una prueba suma de rangos U de Mann-Whitney, para determinar si existió diferencia entre los grupos. Se consideraron diferencias significativas cuando la p fue menor de 0,05.

RESULTADOS

Efecto de la inyección de 6-hidroxidopamina sobre las células que expresan tirosina hidroxilasa en sustancia negra

La inyección estereotáctica de la neurotoxina 6-OHDA en la SNc produjo la pérdida casi completa de células dopaminérgicas en dicha estructura, del hemisferio derecho donde fue inyectada. Al realizar el estudio inmunohistoquímico, para la detección de células TH+, casi no se observaron células teñidas del lado lesionado, en tanto se evidenció una fuerte tinción en el lado contralateral a la lesión (Fig. 2). Esto confirmó la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc inducida por la inyección de 6-OHDA.

La inyección unilateral de 6-OHDA en el núcleo subtalámico derecho induce una pérdida parcial de células dopaminérgicas TH+ en la *substantia nigra pars compacta* del hemisferio ipsilateral (Fig. 3).

Efectos de la denervación dopaminérgica del núcleo subtalámico inducida por inyección de 6-hidroxidopamina en dicho núcleo sobre la conducta motora

Evaluación de la conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos

La administración de D-anfetamina en el grupo al cual se le inyectó unilateralmente 6-OHDA en el NST, provocó una conducta de giro similar a la inducida por este mismo agonista dopaminérgico en las ratas con inyección de la neurotoxina en la SNc (Fig. 4A). Los análisis estadísticos no revelaron diferencias significativas entre ambos grupos. Por el contrario, el grupo control sano, después de la administración de D-anfetamina, mostró un aumento en la actividad motora general, pero una actividad rotatoria azarosa, con un menor número de vueltas y donde no hay un predominio de rotaciones en un solo sentido. Este último grupo mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los dos anteriores para esta conducta (Fig. 4A).



Fig. 2. Fotografía de un corte coronal de cerebro de rata después de la inyección de 6-OHDA en la SNc. Observar la ausencia de células inmunorreactivas al anticuerpo anti-TH en la zona correspondiente a la *substantia nigra pars compacta* del hemisferio derecho en comparación con el lado izquierdo sano. (5x).

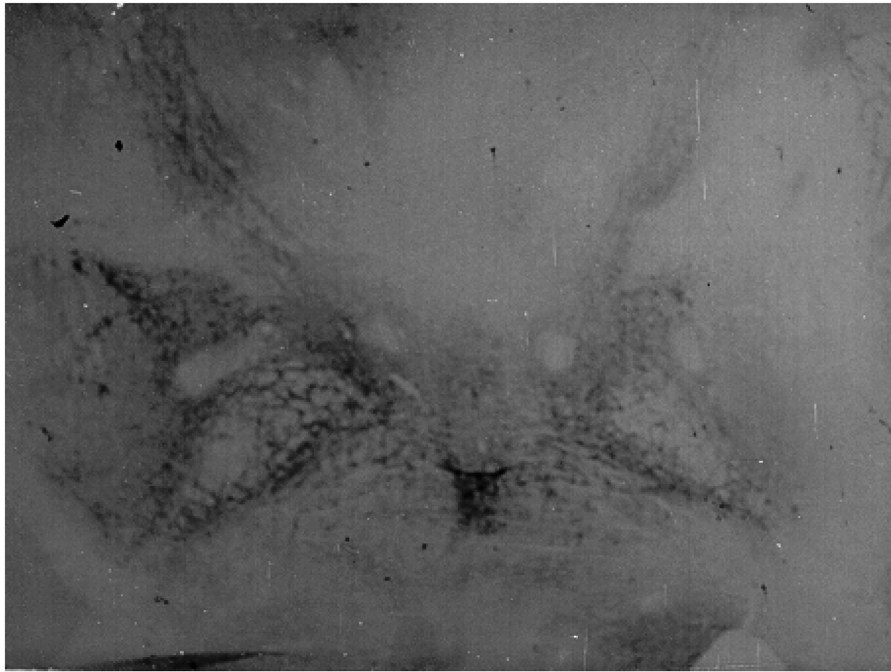


Fig. 3. Fotografía de un corte coronal de cerebro de rata después de la inyección de 6-OHDA en NST. Observar la ausencia de células inmunorreactivas al anticuerpo anti-TH en la zona correspondiente a la substantia nigra pars compacta del hemisferio derecho en comparación con el lado izquierdo sano. (5x).

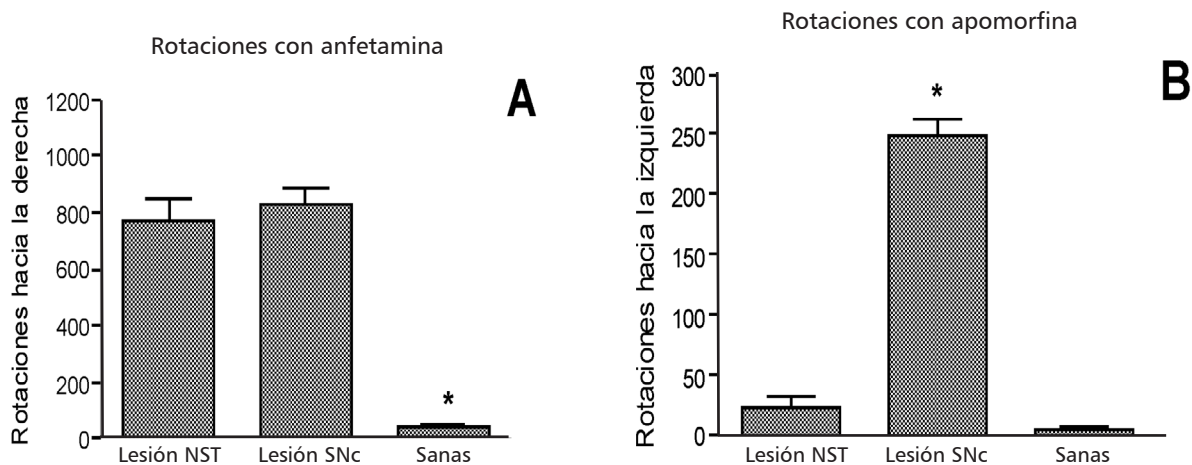


Fig. 4. Conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos en ratas con denervación dopaminérgica secundaria a la inyección unilateral de 6-OHDA en la SNc o el NST. A) Se muestran las medias \pm error estándar de la media de las rotaciones inducidas por D-anfetamina en todos los grupos experimentales (análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal-Wallis, $H(2, N = 72) = 41,33506$, $*p < 0,05$, $U = 13,0$, Prueba de U de Mann-Whitney). B) Aparecen las medias \pm error estándar de la media de las rotaciones inducidas por apomorfina en todos los grupos experimentales (análisis de varianza de rangos de una vía Kruskal-Wallis, $H(2, N = 71) = 43,01231$, $*p < 0,01$, $U = 0,0$, Prueba de la U de Mann-Whitney, grupo lesión en SNc vs. grupo con lesión en NST y grupo sanas).

La administración de apomorfina evocó una respuesta diferente en los grupos experimentales (Fig. 4B). Las ratas con lesión de neuronas dopaminérgicas inducida por la inyección de 6-OHDA en la SNc mostraron una conducta de giro intensa en sentido contralateral al hemisferio lesionado, significativamente mayor que el resto de los grupos ($p < 0,05$). Por otro lado, el grupo con lesión en el núcleo subtalámico, no mostró diferencias significativas en la conducta de giro evocada por la apomorfina en relación con el grupo control sano ($p = 0,34$, Prueba de la U de Mann-Whitney) (Fig. 4B). El número de rotaciones en el grupo con lesión del NST fue inferior a 150 giros en 45 min, que es el criterio rotacional considerado por muchos autores, de una denervación nigro-estriatal mayor del 80 %.

Evaluación del uso de las extremidades anteriores en ratas con lesión inducida por la inyección de 6-OHDA en el núcleo subtalámico o la substantia nigra pars compacta. Ocho semanas después de la fecha de inyección de la neurotoxina 6-OHDA, fueron evaluadas las habilidades motoras de las extremidades anteriores en los tres grupos experimentales.

Los animales sanos fueron capaces de retirar más del 60 % de los trociscos de alimentos en ambos lados de la escalera al final del experimento (Fig. 5 A y B). La comparación de las habilidades motoras entre las extremidades (derecha e izquierda) dentro de este grupo no mostró diferencias significativas.

Los grupos de animales lesionados por inyección de 6-OHDA, tanto en SNc como en NST, mostraron dificultad en alcanzar los alimentos con ambas extremidades, aunque el defecto motor fue más pronunciado en la extremidad contralateral al hemisferio lesionado (Fig. 5 A y B). Los análisis estadísticos confirmaron diferencias significativas en el uso de la extremidad izquierda entre el grupo control sano y ambos grupos de animales lesionados ($p < 0,05$) (Fig. 5 A).

En el grupo con lesión en la SNc, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las habilidades motoras de la extremidad derecha y la izquierda (ANOVA $F_{1,38} = 17,624\ 25$, $p < 0,05$ combinado con una prueba Newman Keuls); mientras que en el grupo con lesión en el NST no hubo diferencias significativas en el desempeño de ambas extremidades anteriores (ANOVA $F_{1,38} = 0,226\ 06$).

Finalmente, los grupos de animales lesionados, tanto en NST como en SNc, mostraron dificultad en el uso de la extremidad anterior derecha (ipsilateral al hemisferio lesionado) y se diferenciaron de manera significativa del grupo control sano (Fig. 5 B).

Efecto de la inyección de 6-hidroxidopamina en el núcleo subtalámico sobre las células que expresan tirosina hidroxilasa en sustancia negra

Los estudios morfológicos evidenciaron que la inyección de 6-OHDA en el NST, induce una pérdida parcial de neuronas en la SNc, evidenciada por una disminución en la inmunoreactividad a la enzima tirosina hidroxilasa, en el hemisferio lesionado.

En resumen, la pérdida de la inervación dopaminérgica del NST provoca una asimetría en la conducta motora de los animales que se traduce en un peor desempeño en las habilidades, que alcanza significación estadística sólo en la extremidad contralateral a la lesión. Además, la administración del agonista dopaminérgico D-anfetamina en estos animales induce una conducta motora rotacional intensa, ipsilateral al hemisferio lesionado. Esta asimetría es similar a la observada después de una lesión completa de la SNc, por inyección de la neurotoxina en dicha estructura. La administración de apomorfina induce una conducta rotatoria contralateral a la lesión que no se diferencia significativamente de la observada en los controles sanos.

DISCUSIÓN

Las rotaciones inducidas por D-anfetamina y apomorfina, fueron utilizadas en este trabajo, como predictoras de efectividad de la lesión. Clásicamente esta prueba ha sido empleada para valorar la asimetría en la concentración de dopamina de los núcleos basales de ambos hemisferios. Sin embargo, existen divergencias en cuanto a considerar a estas pruebas conductuales como buenas predictoras de una lesión de la vía dopaminérgica nigro-estriatal mayor del 80 %. Varios autores han descrito la existencia de animales con lesión parcial de esta vía (disminución en la concentración de dopamina en el cuerpo estriado menor del 80 %) que rotan más de 650 vueltas completas en 90 min después de recibir una inyección de D-anfetamina; pero no más de 150 vueltas completas en 45 min, después de la inyección con apomorfina.^{29,30} Por esta razón, se ha sugerido que la apomorfina es un mejor predictor de lesiones completas de la SNc, producidas por 6-OHDA.

Los efectos sobre la conducta de giro de la denervación dopaminérgica aislada del NST no han sido explorados con anterioridad a este trabajo. Estos resultados muestran que la lesión específica de las neuronas dopaminérgicas que inervan al NST, produce una conducta de giro en respuesta a la D-anfetamina similar a la obtenida tras lesión directa de la SNc. Por otro lado, la administración de apomorfina produjo una conducta de giro en el grupo de animales con lesión del NST mayor que en el grupo control sano, pero que fue significativamente menor a la conducta de giro evocada por este mismo medicamento en el grupo con lesión de la SNc. En nuestro criterio, el comportamiento conductual de los animales con lesión dopaminérgica del NST es similar al observado en animales con lesiones parciales de la SNc.³¹ Esto está relacionado con el hecho de que la inyección de la neurotoxina en el NST causa solo la degeneración de las células dopaminérgicas (o parte de ellas) de la SNc, que inervan a este núcleo o pasan cerca de él.

La conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos, en el modelo de hemiparkinsonismo en ratas, no resulta suficiente para medir el grado de déficit motor presente en estos animales. La acinesia, uno de los síntomas cardinales de la EP en el humano, no es posible valorarla por este tipo de prueba. En este sentido, la

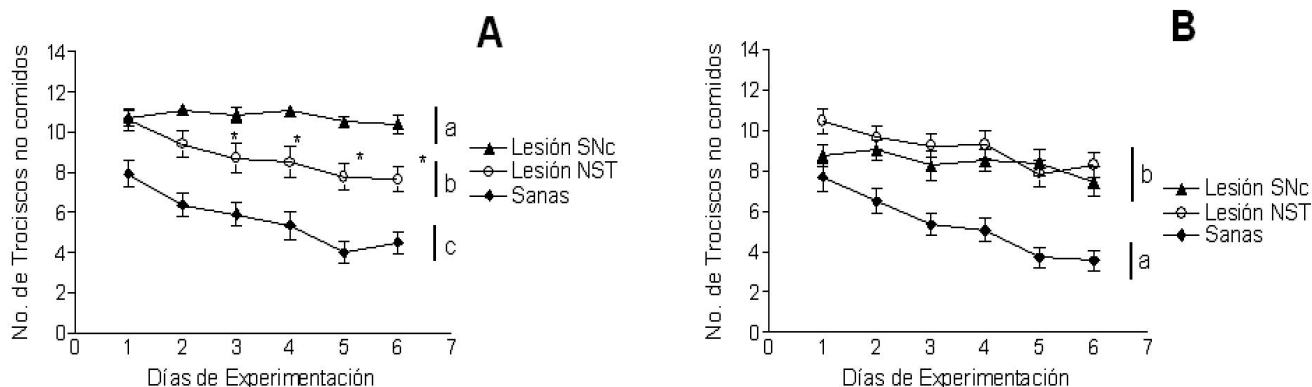


Fig. 5. Habilidades motoras de las extremidades anteriores de ratas con lesión unilateral de la SNc o el NST. A. Extremidad anterior izquierda, se muestran los valores medios \pm ESM (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{2,57} = 39,48$, $p < 0,05$ combinado con una prueba Newman Keuls). El grupo con lesión en el NST, a pesar de tener afectación en el desempeño motor, muestra una mejoría, que es significativa, en la ejecución de esta conducta en los días de experimentación (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{5,285} = 13,38$, $*p < 0,05$ combinado con una prueba Newman Keuls). B. Extremidad anterior derecha (ANOVA de dos vías con mediciones repetidas $F_{2,57} = 17,93$, $p < 0,05$ combinado con una prueba Newman Keuls).

prueba de habilidad manual ha sido utilizada por varios autores para cuantificar el deterioro motor presente en este modelo.^{28,29}

La lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas que inervan al NST trajo como consecuencia pérdida de las habilidades motoras de ambas extremidades en comparación con el grupo control sano. No obstante, no hubo una afectación preferencial de la extremidad contralateral a la lesión. Aunque la inervación dopaminérgica del NST no resulta tan extensa como la del cuerpo estriado, el impacto que tiene la pérdida de esta sobre la conducta motora demuestra su importancia en la génesis de las alteraciones conductuales presentes en el hemiparkinsonismo en ratas.

La existencia en el NST de terminaciones neuronales dopaminérgicas procedentes de la SNc ha sido documentada a partir de estudios anatómicos e inmunocitoquímicos.^{32,33} Dentro de estos se puede mencionar, la presencia de pequeños procesos varicosos inmunorreactivos a la tirosina hidroxilasa o dopamina en el NST.³⁴ Además, se han encontrado células marcadas, empleando técnicas de marcaje retrógrado a partir del NST, tanto en SNc como en el área tegmental ventral.²⁷ Adicionalmente, estudios que inyectan trazadores anterógrados en SNc, han demostrado la existencia de terminales marcadas en el NST.^{35,36}

El papel crucial que ejerce la inervación dopaminérgica sobre la actividad neuronal del NST había sido sugerida con anterioridad por otros autores, a través de experimentos que estudian el efecto de la inyección de dopamina directamente sobre el NST.^{23,24,37-39} Con los resultados de este trabajo se demuestra que la pérdida selectiva de la inervación dopaminérgica del NST es responsable, al menos en parte, de las alteraciones conductuales presentes en el modelo de hemiparkinsonismo en ratas.

La capacidad de la DA para modular la actividad neuronal en el NST se conoce hace ya algunos años.^{40,41} La administración sistémica de agonistas dopaminérgicos induce un marcado incremento en la utilización de glucosa en el NST, la cual puede ser bloqueada por haloperidol.^{23,42,43} Aunque estos resultados pueden ser explicados por una acción indirecta de la dopamina sobre el cuerpo estriado, más que por un efecto directo sobre el NST, otros estudios demuestran que la aplicación directa de dopamina sobre las neuronas del NST induce un incremento dosis dependiente del intervalo de descarga de estas (el cual es atenuado por antagonistas dopaminérgicos) afirmación que ha sido bien avalada.^{23,42,44}

En conjunto estos hallazgos sugieren que la SNc modula directamente la actividad de las neuronas del NST y que la pérdida de la inervación dopaminérgica al NST, puede contribuir a la actividad anormal de las neuronas de este núcleo tanto en la EP como en los modelos animales de la enfermedad. El NST ocupa una ubicación estratégica dentro de la organización funcional de los ganglios basales por varias razones. En primer lugar, es el único núcleo dentro de los ganglios basales formado por neuronas excitadoras glutamatérgicas, lo cual hace que la influencia de sus eferencias, sea cualitativamente diferente a la del resto de los núcleos de los GB. En segundo lugar, recibe de la corteza cerebral una aferencia monosináptica glutamatérgica ipsilateral y aferencias contralaterales de tipo oligosinápticas. Finalmente, este núcleo influye tanto sobre las vías tálamo-corticales (ascendentes) como sobre estructuras del tallo cerebral relacionadas con el control de la musculatura axial y de la marcha (descendentes), lo cual le confiere la propiedad

de modificar simultáneamente la actividad cortical, de estructuras diencefálicas y del tallo cerebral. De ahí, la relevancia que puede tener su disfunción en los trastornos motores presentes en la EP

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barraquer L, Martí MJ, Barraquer ML, Gil D. Evolución Histórica del conocimiento de la Enfermedad de Parkinson. In: Obeso JA, Tolosa ES, Grandas FJ (eds.), Tratado sobre Enfermedad de Parkinson. Laboratorios DU PONT Pharm S.A. 1997;p.15-22.
2. Scorttcati MC, Micheli F. Historia de la Enfermedad de Parkinson. En: Micheli FE (ed.), Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.: 1998:1-7.
3. Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. Trends Neurosci. 2000;23 (Suppl. Basal ganglia, Parkinson's disease and levodopa therapy) (10):S8-S19.
4. Alheid GF, Heimart L, Switzer RC. Basal Ganglia. In: Paxinos G (ed.), The Human Nervous System. San Diego: Academic Press. 1990:483-582.
5. Rodríguez MC, Rodríguez M, Obeso JA. Organización y función de los ganglios basales. Modelos experimentales. En: Obeso JA, Tolosa ES, Grandas FJ (eds.), Tratado sobre la Enfermedad de Parkinson. Edición en CD-ROM. Laboratorios DU PONT Pharma S.A. y Ediciones Doyma S.L.: 2000:113-126.
6. Smith Y and Kieval J Z. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. Trends in Neurosciences. 2000;23:S28-S33.
7. Middleton FA and Strick PL. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. Brain Res Rev. 2000;31:236-250.
8. Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Lévesque M, and Parent M. Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization., Trends in Neurosciences. 2000;23:S20-S27.
9. Albin R, Young A, and Penny J. The functional anatomy of Basal Ganglia disorders. Trends in Neurosciences. 1989;12:366-375.
10. Young AB, Penney JB Jr. Biochemical and functional organization of the basal ganglia. In: Jankovik J, Tolosa ES (eds.), Parkinson's disease and movement disorders. Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo: Williams & Wilkins. 1998:1-14.
11. Wichmann T and DeLong MR, Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. Adv Neurol. 2003;91:9-18.
12. Onn SP, West AR, and Grace AA. Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions. Trends Neurosci. 2000;23:S48-S56.
13. Vitek JL and Girez M. Physiology of hypokinetic and hyperkinetic movement disorders model for dyskinesia. Ann of Neurology. 2000;47:S131-S140.
14. Fahn S. The spectrum of L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. Ann Neurol. 2000;47(Suppl. 1):S2-S11.
15. Abrous DN, Dunnett SB. Paw reaching test in rats: the staircase test. Neuroscience Protocols. 1994;94-010-03-01-11.
16. Schwarting R, Bonatz A, Carey RJ, Huston JP. Dopamine denervated hemisphere levels of dopamine in 6-OHDA lesion animals are related to different types of rotational movements. Brain Res. 1991;554:46-55.
17. Ungerstedt U. 6-hydroxydopamine induced degeneration central dopamine neurons. J Pharmacol. 1968;5:107-111.
18. Cragg SJ, Baufretton J, Xue Y, Bolam JP, Bevan MD. Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus. Eur J of Neurosci. 2004;20(7):1788-1802.
19. Hirsch EC, Périer C, Orioux G, Francois Ch, Féger J, Yelnik J, Vila M, Levy R, Tolosa ES, Marin C, Obeso JA, Agid Y. Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. Trends Neurosci. 2000;23(10):S78-S85.
20. Bevan MD, Bolam JP. Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. J Neurosci. 1995;15:7105-7120.

21. Orieux G, Francois C, Feger J, Yelnik J, Vila M, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC. Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunclopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2000;97(1):79-88.
22. Orieux G, Francois C, Feger J, Yelnik J, Vila M, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC. Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunclopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2000;97(1):79-88.
23. Hassani OK, Feger J. Effects of intrasubthalamic injection of dopamine receptor agonists on subthalamic neurons in normal and 6-hydroxydopamine rats: an electrophysiological and c-Fos study. *Neuroscience*. 1999;92(2):533-543.
24. Hassani OK, Francois Ch, Yelnik J, Feger J. Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Research*. 1997;749:88-94.
25. Hazrati LN, Parent A. Convergence of subthalamic and striatal efferents at pallidal level in primates: and anterograde double-labeling study with biocytin and PHA-L. *Brain Res*. 1992;569:336-340.
26. Smith Y, Charara A, Parent A. Synapsis innervation of mid-brain dopaminergic neurons by glutamate-enriched terminals in the squirrel monkey. *J Comp Neurol*. 1996;364:231-253.
27. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: 2nd the Academic Press; 1986.
28. Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Dunnett SB. The Staircase test: A measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Meth*. 1991;36:219-228.
29. Barnéoud P, Parmentier S, Mazadier M, Miquiep JM, Boireau A, Dubedat P, Blanchard JC. Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience*. 1995;67(4):837-848.
30. Hudson JL, van Horne CG, Strömberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA. Correlation of apomorphine and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Research*. 1993;626:167-174.
31. Pavón N, Vidal L, Álvares P, Blanco L, Torres A, Rodríguez A, Macías R. Evaluación conductual del modelo de lesión unilateral en ratas con 6-hidroxidopamina. Correlación entre las rotaciones inducidas por D-Anfetamina, Apomorfina y la Prueba de Habilidades Manuales. *Neurología*. 1998;26:915-918.
32. Mallet N, Pogossyan A, Sharott A, Csicsvari J, Bolam JP, Brown P, Magill PJ. Disrupted dopamine transmission and the emergence of exaggerated beta oscillations in subthalamic nucleus and cerebral cortex. *J Neurosci*. 2008;28(18):4795-806.
33. Breit S, Martin A, Lessmann L, Cerkez D, Gasser T, Schulz JB. Bilateral changes in neuronal activity of the basal ganglia in the unilateral 6-hydroxydopamine rat model. *J Neurosci Res*. 2008;86(6):1388-96.
34. Lewis DA, Sesack SR. Dopamine systems in the primate brain. In: Bloom FE, Björklund A, Hökfelt T (eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam: Elsevier B.V.: 1997:263-375.
35. Gauthier J, Parent M, Levesque M, Parent A. The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Research*. 1999;834:228-232.
36. Hanley JJ, Bolam JP. Synaptology of the nigrostriatal projection in relation to the compartmental organization of the neostriatum in the rat. *Neuroscience*. 1997;81:353-370.
37. Hassani OK, Mouroux M, Bohme GA, Stutzmann JM, Feger J. Riluzole reduces hyperactivity of subthalamic neurons induced by unilateral 6-OHDA lesion in the rat brain. *Movement Disorders* 2001;16(6):1110-1114.
38. Shen KZ, Zhu ZT, Munhall A, Johnson SW. Dopamine receptor supersensitivity in rat subthalamus after 6-hydroxydopamine lesions. *Eur J Neurosci*. 2003;18(11):2967-74.
39. Yong Sook Park, Mi Fa Jeon, Bae Hwan Lee, Jin Woo Chang, M.D. Lesion of Subthalamic Nucleus in Parkinsonian Rats: Effects of Dopamine D1 and D2 Receptor Agonists on the Neuronal Activities of the Substantia Nigra Pars Reticulata. *J Korean Neurosurg Soc* 2007;42(6):455-461.
40. Ampe B, Massie A, D'Haens J, Ebinger G, Michotte Y, Sarre S. NMDA-mediated release of glutamate and GABA in the subthalamic nucleus is mediated by dopamine: an *in vivo* microdialysis study in rats. *J Neurochem*. 2007;103(3):1063-74.
41. Breit S, Martin A, Lessmann L, Cerkez D, Gasser T, Schulz JB. Bilateral changes in neuronal activity of the basal ganglia in the unilateral 6-hydroxydopamine rat model. *J Neurosci Res*. 2008;86(6):1388-96.
42. Smith Y, Kieval JZ. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*. 2000;23(10 Suppl):S28-S33.
43. Marino MJ, Awad-Granko H, Ciombor KJ, Conn PJ. Haloperidol-induced alteration in the physiological actions of group I mGlu in the subthalamic nucleus and the substantia nigra pars reticulata. *Neuropharmacology*. 2002;43(2):147-59.
44. Rodríguez-Oroz MC, Obeso JA, Olanow CW. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol* 1998;44(Suppl.1):S175-S188.