

Inyección intracerebral (sustancia nigra compacta) de hierro dextrano como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson

Alfonso Alfaro Rodríguez,* Rigoberto González Piña,** Krystell Padilla Martín,* Rebeca Uribe Escamilla***

Resumen

ANTECEDENTES

La enfermedad de Parkinson se distingue por la destrucción progresiva y selectiva de neuronas dopaminérgicas nigroestriales. Se ha relacionado con el metabolismo oxidante de la dopamina, la generación de peróxido de hidrógeno y la formación de neurotoxina 6-hidroxidopamina. El peróxido de hidrógeno puede dañar directamente al tejido o favorecer la producción de radicales de oxígeno. Estos procesos son favorecidos por las bajas concentraciones de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, las cuales se encuentran en el sistema nervioso central y en el cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson.

OBJETIVO

Establecer un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson con hierro dextrano y distinguir los efectos conductuales y neuroquímicos después de inyectar 1 µL de hierro dextrano en la sustancia nigra compacta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 40 ratas macho de la cepa Wistar de 260 a 310 g, a las cuales se les aplicó una microinyección de 1 µL de hierro dextrano en la sustancia nigra compacta derecha con una micropipeta de 10 µm de grosor y se observó su comportamiento motriz de manera directa, diariamente, durante 30 días. A otro grupo se le aplicó una microinyección de 1 µL de hierro dextrano en la sustancia nigra compacta derecha y se les sacrificó por decapitación, a los 7 y 30 días. Se disecó el cuerpo estriado y se analizó el contenido de dopamina con la técnica de cromatografía de líquidos (HPLC). A los resultados obtenidos se les realizó análisis de variancia y la prueba de Tukey ($p < 0.001$).

RESULTADOS

En cuanto a las características conductuales, los animales inclinaron la cabeza del lado contralateral a la microinyección. Esta caracte-

Abstract

BACKGROUND

Parkinson's disease (PD) is featured by progressive and selective destruction in the nigrostriatal dopaminergic neurons. Dopamine's oxidative metabolism, the hydrogen peroxide (H_2O_2) generation and the production of the 6-hydroxydopamine neurotoxin have been associated. H_2O_2 may damage directly to the tissues or facilitate the productions of oxygen free radicals. Such a fact is enhanced by low levels of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase, which are found in the central nervous system in some extent.

OBJECTIVE

To develop a Parkinson's disease experimental model by means of the study of the neurochemical and behavioral effects after the administration of 1 µL of dextran Ferrum (D Fe) into the substantia nigra compacta (SNc) by means of a micropipette (10 µm thick).

MATERIAL AND METHODS

40 male wistar rats were used (260-310 g). D Fe was injected in the right SNc and their motor performance was evaluated during 30 days. Another group was decapitated after either, 7 or 30 days in order to obtain the striatum dopamine content were analyzed by means of high performance liquid chromatography. Results were analyzed by means of an ANOVA and a pos hoc Tukey t test ($p < 0.001$).

RESULTS

Behavioral test showed that the animals maintained a head's inclination contralateral to the microinjection's site, increasing gradually along time post-injection. Moreover, contralateral fore and hindlimb crawling, and contralateral rotational movements were also observed. On the other hand, dopamine levels decreased after 7 and 30 days post-injection.

* Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología.

** Laboratorio de Plasticidad Cerebral.

*** División de Investigación.

Instituto Nacional de Rehabilitación.

Correspondencia: Dr. Alfonso Alfaro Rodríguez, Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología, Torre de Investigación 1er piso, Instituto Nacional de Rehabilitación. Calzada México-Xochimilco 289, colonia Arenal de Guadalupe, CP 14389, México, DF. E-mail: aalfaro@salud.gob.mx

rística aumentaba progresivamente; además, arrastraban las patas delantera y trasera, contralaterales y tenían movimientos de giro del lado contralateral. Al hacer la cuantificación de dopamina se observó decremento significativo en la concentración de este neurotransmisor a los 7 y 30 días de la microinyección.

CONCLUSIONES

La inyección de hierro dextrano acelera el proceso de peroxidación y éste, a su vez, provoca los síntomas progresivos de la enfermedad de Parkinson.

Palabras clave:

enfermedad de Parkinson, sustancia nigra compacta, dopamina, hierro dextrano.

CONCLUSION

The D Fe injection accelerated the peroxydation mechanisms, leading to a progressive development of Parkinson's disease.

Key words:

Parkinson's disease, substantia nigra compacta, dopamine, dextran ferrum.

Antecedentes

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo de los ganglios basales que evoluciona hasta dejar al paciente incapacitado para realizar movimientos voluntarios. La padece aproximadamente 1% de la población después de los 55 años de edad. Primero se detecta ligero temblor en una o varias extremidades, rigidez muscular, anomalías posturales y bradicinesia. Estos síntomas se pueden acompañar de pérdida del apetito y, subsiguientemente, pérdida de peso, depresión, disminución de la capacidad intelectual y disfunciones autónomas. La gravedad de los síntomas puede aumentar en el transcurso de 10 a 15 años, hasta reducir al paciente a un estado de completa acinesia y demencia.^{1,2}

La enfermedad de Parkinson se distingue por disminución de dopamina en el cuerpo estriado como resultado de la pérdida neuronal en la sustancia nigra compacta. La disminución de dopamina tiene como consecuencia la degeneración de las vías dopaminérgicas nigroestriales. Se conoce muy poco acerca de la causa de muerte de las células dopaminérgicas o del mecanismo mediante el cual se degeneran. Una hipótesis con la cual se ha tratado de explicar el origen de la enfermedad de Parkinson es a través de compuestos tóxicos exógenos o endóge-

nos del cuerpo, a corto y largo plazo, en la función neuronal. El incremento de las concentraciones de hierro es un catalizador potencial de la reacción de radicales libres. Se propuso que la acumulación patológica de hierro en la enfermedad de Parkinson puede provocar incremento del estrés oxidante con la acumulación de radicales libres y la peroxidación lipídica subsiguiente.³⁻⁸ Uno de los factores endógenos que participa en la generación de radicales libres es la concentración alta de dopamina en las neuronas nigroestriales. Por cada mol de dopamina oxidada por monoamino oxidasa se genera un mol de peróxido de hidrógeno, el cual puede dañar directamente al tejido o incrementar la producción de radicales de oxígeno. Estos procesos son favorecidos por las concentraciones bajas de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, las cuales se encuentran en el sistema nervioso central.

El peróxido de hidrógeno, a pesar de no ser en sí mismo un radical, es de vital importancia, ya que con los metales de transición Cu^+ o Fe^{2+} provoca la reacción de Fenton con la producción del radical hidroxilo. Así, el estrés oxidante puede incrementarse por la presencia de estos metales.

Otra manera de formación de radicales libres es a través de la síntesis de

neuromelanina en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.^{9,10}

Sengstock y sus colaboradores¹¹ trabajaron con infusiones de cloruro de hierro en la sustancia nigra a diferentes concentraciones: baja (2.5 mm), media (4.2 mm) y alta (6.3 ó 12.6 mm). Encontraron disminución en la concentración de dopamina y sus metabolitos (DOPAC y HVA) en el cuerpo estriado a los dos meses postinfusión, además de muerte celular en la zona a partir de la concentración media. Estos mismos autores, al inyectar hierro en concentraciones de 1.25 ó 2.10 nmoles, y al medir la concentración de dopamina y sus metabolitos a los dos, cuatro y seis meses, encontraron disminución de dopamina y sus metabolitos.¹²

El propósito de este trabajo es establecer un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson con hierro dextrano, que se manifiesta de manera progresiva neuroquímica y conductualmente, y distinguir los efectos conductuales y neuroquímicos después de inyectar 1 μL de hierro dextrano en la sustancia nigra compacta.

Material y métodos

Se utilizaron 40 ratas macho de la cepa Wistar con peso de 260 a 310 g; se mantuvieron en cajas estándar de bioterio con libre acceso a comida y agua, y se

formaron tres grupos: el control ($n = 8$), otro al que se le inyectó 1 μL de solución salina ($n = 16$) y al último se le inyectó 1 μL de hierro dextrano ($n = 16$) en la sustancia nigra compacta derecha con una micropipeta de 10 μm de grosor. La microinyección se realizó con anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso), con las siguientes coordenadas estereotáxicas: antero posterior = 3.7, lateral = 2.0 y profundidad = 2.5. Se tomó como referencia la línea interaural de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson.¹³ Los animales fueron decapitados para extraer el cuerpo estriado ipsilateral y contralateral a la microinyección (según la técnica de Glowinski e Iversen),¹⁴ a los 7 ($n = 8$) y 30 ($n = 8$) días después de la microinyección, con el propósito de cuantificar el contenido de dopamina. Se pesó el tejido y, posteriormente, se homogeneizó a 14,000 rpm durante 13 minutos. El sobrenadante se inyectó a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC Perkin Elmer modelo 1020) y se cuantificó con un detector electroquímico con potencial de oxidación de 0.600 volts vs un electrodo de referencia Ag/AgCl. Los datos neuroquímicos se compararon con el grupo control y el de solución salina, mediante un análisis de variancia para un diseño completamente al azar de dos factores. Cuando tenían diferencias significativas ($p < 0.01$) se aplicaba la prueba de comparación de medias Tukey con $p < 0.01$.

Los grupos de 30 días con la microinyección de solución salina ($n = 8$) y dextrano ($n = 8$) sirvieron para evaluar la respuesta motora, la cual consistió en observar la postura general (posición de la cabeza y cuerpo), la fuerza de las extremidades (resistencia de oposición al estiramiento pasivo) y la colocación de las extremidades (la rata era levantada de la cola y se observó la posición de las extremidades traseras, ya que el estiramiento hacia afuera es normal y si se desviaban hacia atrás más de 45 grados y tendían a mantenerlas pegadas al

cuerpo se consideraba anormal). A cada conducta se le asignó una calificación de 0 a 5 puntos, la cual iba de normal a alteración grave. Al final de cada sesión se sumó el puntaje obtenido y la evaluación se realizó cada tercer día durante un mes. Los resultados se compararon estadísticamente con la prueba de la t de Student con $p < 0.01$.

Resultados

Parámetros conductuales

Como parte de la conducta, los animales manifestaron, el primer día después de la microinyección con dextrano, inclinación lateral de la cabeza, mientras que las ratas que se inyectaron con solución salina no tuvieron esta conducta. La fuerza de las extremidades se calificó como de débil a moderada en 100% de estos animales con FID (Escala de Fuerza Izquierda o Derecha), mientras que en el grupo de solución salina fue calificado de moderada a fuerte. Las ratas, al ser levantadas por la cola, tenían tendencia a pegar las extremidades y doblarlas al cuerpo en los animales con 1 mg de hierro dextrano y las ratas que recibieron solución salina las mantenían hacia fuera y estiradas; esta conducta es calificada como normal. Un comportamiento que se observó en los animales con dextrano fue que tenían movimientos de giro del lado contralateral de la microinyección. En el cuadro 1 se muestran las conductas que denotan diferencias entre ambos grupos.

Al realizar la suma de calificaciones asignadas a cada conducta por día se observó que las ratas inyectadas con dextrano mostraron puntajes promedio de 4.016, mientras que los animales con solución salina tuvieron valores promedio de 0.712; la diferencia fue significativa al comparar ambos grupos (figura 1).

Neuroquímica

Al hacer la cuantificación de dopamina en el cuerpo estriado ipsilateral y contralateral, y al compararla entre ellos por grupo, no mostró diferencias significativas. Al comparar los datos del grupo de solución salina y el de dextrano en los diferentes días de sacrificio con los datos del grupo control y el grupo de solución salina se observó decremento significativo en la concentración de dopamina en los grupos que recibieron dextrano a los 7 y 30 días después de la microinyección (figura 2).

Discusión

En este trabajo se encontró que al realizar la microinyección de dextrano hubo alteraciones motoras y disminución de la concentración de dopamina en el cuerpo estriado, en contraste con el grupo al que sólo se le administró solución salina. Por lo tanto, la sola introducción de la micropipeta no produjo daño. En los modelos quirúrgicos, para provocar la enfermedad de Parkinson se necesitan grandes extensiones de lesión para encontrar alteraciones.¹⁵ Por este motivo,

Cuadro 1. Conductas observadas que tienen diferencia entre los dos grupos (solución salina y hierro dextrano)

Conducta	Solución salina	Hierro dextrano
Inclinación lateral de la cabeza	No	Sí
Fuerza de las extremidades	Moderado-fuerte	Débil-moderado
Colocación de las extremidades	Posición afuera estiradas	Desviación de 90°

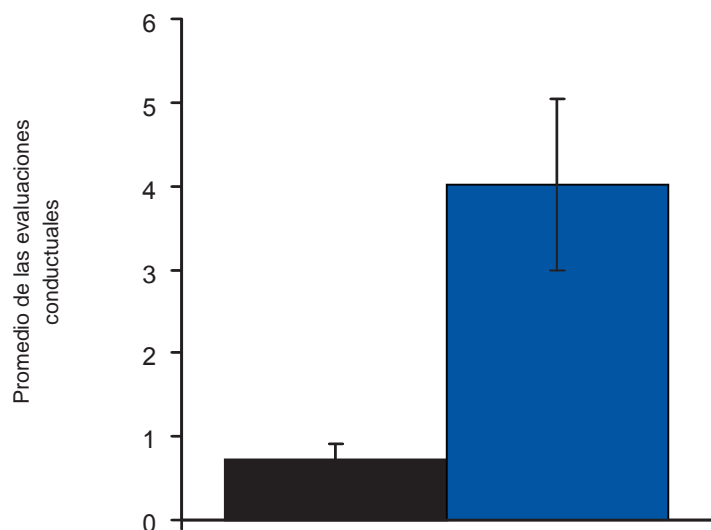


Figura 1. Promedio de los puntajes obtenidos después de la valoración motora a los 30 días de la administración de solución salina y hierro dextrano. Las barras muestran la media \pm error estándar; la barra blanca (solución salina) y la barra azul (hierro dextrano) tienen diferencias significativas entre los dos grupos. Se aplicó la prueba de la t de Student. * $p < 0.001$.

se cree que los efectos encontrados en los grupos a los que se les inyectó dextrano se deben al incremento de hierro en la sustancia nigra compacta, lo cual favorece la producción de radicales libres y, con ello, el daño a las neuronas dopaminérgicas y a sus conexiones con otros grupos neuronales. Los estudios

post mortem revelan que los cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson contienen hierro en cantidades significativamente altas en comparación con los cerebros de adultos sin ninguna afección neurológica.¹⁶ Además, tienen bajas concentraciones de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa.¹⁷

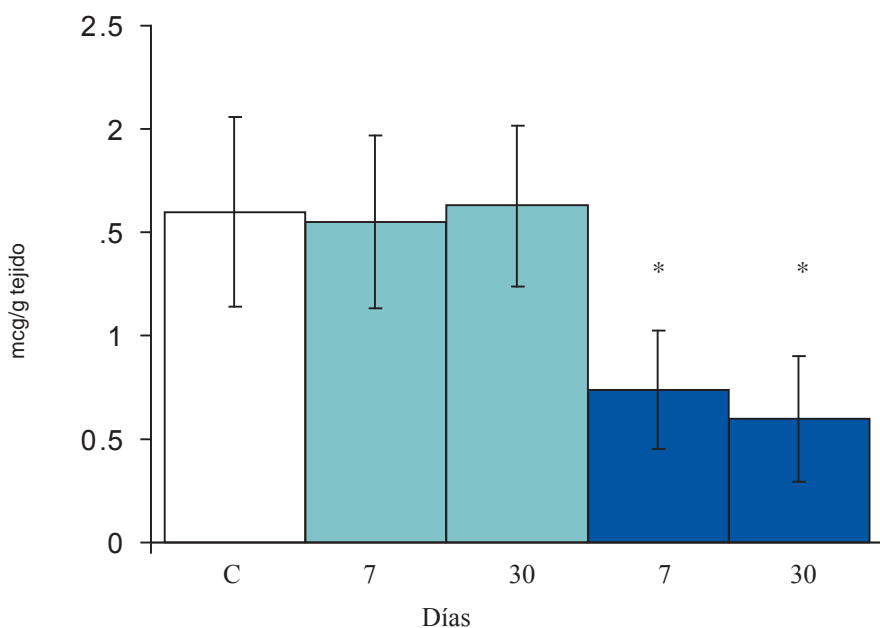


Figura 2. Concentración promedio de dopamina en el cuerpo estriado. La barras muestran la media \pm error estándar; la blanca es la de control, las verdes son para solución salina (7 y 30 días) y las azules de hierro dextrano (7 y 30 días). Se aplicó un ANOVA con * $p < 0.001$ y la prueba de Tukey con diferencias significativas (* $p < 0.001$).

Este estudio coincide con lo reportado por el grupo de Sengstock y col.^{11,12} y el de Sziráki y col.⁷ Ambos inyectaron cloruro de hierro y citrato ferroso en la sustancia nigra y encontraron disminución de dopamina y sus metabolitos a los dos, cuatro y seis meses en el cuerpo estriado y a los siete días después a la microinyección.

Muntané y sus colaboradores¹⁸ administraron dextrano subcutáneamente durante el tratamiento para inflamación y obtuvieron incremento en la producción del anión superóxido y peroxidación lipídica.

Los efectos neuroquímicos que se encontraron pueden explicarse por el proceso de estrés oxidante al reaccionar el hierro inyectado con el peróxido de hidrógeno que se encuentra en la sustancia nigra como producto de la degradación de la dopamina por la MAO B,^{19,20} y genera la formación de radicales libres y la subsiguiente peroxidación lipídica que daña las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y, con esto, la disminución de las concentraciones de dopamina en el cuerpo estriado.

La enfermedad de Parkinson se distingue por la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas; hasta la fecha se desconoce la causa de esta degeneración. Una hipótesis del origen de la enfermedad de Parkinson es en relación con la producción de radicales libres y la incapacidad de las enzimas antioxidantes para mantener las concentraciones normales de radicales^{4,6,7,21,22} y de enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa.

Cuando se compararon los datos ipsilateral y contralateral del mismo grupo no se encontraron diferencias significativas en el grupo de 7 y 30 días con hierro dextrano, lo cual puede explicarse por los efectos de compensación que ocurren en el cuerpo estriado, que incluyen adaptaciones neuroquímicas de las neuronas dopaminérgicas remanentes, capaces de mantener la

función que normalmente mantiene la vía nigroestriatal completa.^{4,23} Este mecanismo se manifiesta en los primeros siete días y el efecto se mantiene para el grupo de 30 días.

El efecto progresivo después de la microinyección se mantiene neuroquímica y conductualmente al menos hasta los 30 días. Esto no sucede con los modelos farmacológicos de la enfermedad de Parkinson, en los cuales se han utilizado inhibidores de las catecolaminas (alfa-metiltirosina) o antagonistas de la dopamina (haloperidol), con los cuales sucede la inhibición dopaminérgica, que reproduce rigidez, incluyendo sedación y acinesia.^{24,25} En modelos de la enfermedad de Parkinson, donde se utilizaron dos neurotoxinas, 1-metil-4-fenil-1, 2, 5,6-tetrahidropiridina (MPTP) y 6-hidroxidopamina (toxinas que actúan específicamente en las neuronas catecolaminérgicas y que provocan acinesia, catalepsia, déficit en la integración sensoriomotora y pérdida de conducta motivada, como comer y beber), los efectos pueden ser revertidos de 10 a 20 minutos por la administración de agonistas de la dopamina (1-dopa y apomorfina).^{26,27}

Se puede concluir que la microinyección de 1 µL de hierro dextrano acelera los procesos de peroxidación y provoca disminución progresiva de la concentración de dopamina y alteraciones motoras similares a las que suceden en la enfermedad de Parkinson.

Agradecimientos

Agradecemos a la M en C Verónica Custodio Ramírez por su asistencia técnica.

Referencias

1. Pisa M. Motor somatopy in the striatum of rat: manipulation, biting and gait. *Behav Brain Res* 1988;27:21-35.
2. Rinne JO, Rummukainen J, Pajjarvi L, Rinne UK. Dementia in Parkinson's disease is related to neuronal loss in the medial substantia nigra. *Ann Neurol* 1989;26:47-50.
3. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2003;5(5):557-61.
4. Zigmond MJ, Stricker EM. Parkinson's disease: Studies with an animal model. *Life Sci* 1984;35:5-18.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14.
6. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993;49(3):577-87.
7. Sziráki I, Rauhala P, Chiueh CC. Novel protective effect of manganese against ferrous citrate-induced lipid peroxidation and nigrostriatal neurodegeneration in vivo. *Brain* 1995;698:285-7.
8. Thiffault C, Aumont N, Quirion R, Poirier J. Effect of MIPTP and L-Deprenyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in mouse brain. *J Neurochem* 1995;65(6):2725-33.
9. Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 1988;334:345-8.
10. Hirsch EC, Mouatt A, Faucheux B, et al. Dopamine, tremor, and Parkinson's disease. *Lancet* 1992;340:25-126.
11. Sengstock GJ, Olanow CW, Dunn AJ, Arendash GW. Iron induces degeneration of nigrostriatal neurons. *Br Res Bull* 1992;28:645-9.
12. Sengstock GJ, Olanow CW, Dunn AJ, Barone S, Arendash GW. Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigral volume, and rotational behavior following iron infusion into the rat substantia nigra experimental. *Neurology* 1994;130:82-94.
13. Paxinos G, Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 1982.
14. Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The disposition of (H³) Norepinephrine, (H³) dopamine and (H³) dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 1996;3:665-9.
15. Poirier LJ, Giguere M, Marchand R. Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in the monkey, cat and rat. *Brain Res Bull* 1983;11(3):371-97.
16. Perry TL, Goidin DV, Hasen S. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett* 1982;33:305-10.
17. Langston JW. Mechanisms underlying neuronal degeneration in Parkinson's disease: an experimental and theoretical treatise. *Mov Dis* 1989;4:5-S25.
18. Muntané J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT. Iron metabolism and oxidative stress during acute and chronic phases of experimental inflammation: Effect of iron-dextran and deferoxamine. *J Lab Clin Med* 1995;126(5):435-43.
19. Konradi C, Kornhuber J, Froelich L, et al. Demonstration of monoamine oxidase A and B in the human brainstem by a histochemical technique. *Neurosci* 1989;33:383-400.
20. Agid Y, Ruberg M, Javoy-Agid F, et al. Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease? *Adv Neuron* 1993;60:148-64.
21. Ebadi M, Srinivasan SK. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 1996;48:1-19.
22. Thiffault C, Aumont N, Quirion R, Poirier J. Effect of MIPTP and L-Deprenyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in mouse brain. *J Neurochem* 1995;65(6):2725-33.
23. Agid Y, Javoy F, Glowinski J. Hyperactivity of remaining dopaminergic neurons after partial destruction of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat. *Nature* 1973;245:150-1.

24. Anden NE, Roos BE, Weidinius B. Effects of chlorpromazine, haloperidol and reserpine on the levels of phenolic acids in rabbit corpus striatum. *Life Sci* 1964;3:149-58.
25. Janssen PAJ, Jagenau AHM, Schellekens KHL. Chemistry and pharmacology of compounds related to 4-(4-hydroxy-4-phenyl-piperidino)- Butyrophenone. Influence of haloperidol (R 1625) and of chlorpromazine on the behavior of rats in an unfamiliar 'Open field' situation. *Psychopharmacol* 1960;1:389-92.
26. Marshall JF, Teitelbaum P. Further analysis of sensory inattention following lateral hypothalamic damage in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1974;86:375-95.
27. Ungerstedt U. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat. *Acta Physiol Scand* 1971;367:95-122.