



Lesión neurotóxica unilateral del núcleo pedunculo pontino: buen acercamiento a un modelo experimental presintomático de enfermedad de Parkinson en ratas

Lisette Blanco Lezcano ¹ <https://0000-0002-8309-7965>
Esteban Alberti Amador ¹ <https://0000-0002-3889-2820>
María Elena González Fraguela ¹ <https://0000-0002-6113-8818>
Mei-Li Díaz Hung ¹ <https://0000-0002-7452-5374>
Bárbara Estupiñán Díaz ¹ <https://0000-0003-2084-2910>
Teresa Serrano Sánchez ¹ <https://0000-0003-4311-2400>
Yamilé Vega Hurtado ¹ <https://0000-0001-5258-3744>
Isabel Fernández Jiménez ¹ <https://0000-0001-7951-6744>

¹ Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: lisette.blanco@infomed.sld.cu lblanco@neuro.ciren.cu

RESUMEN

Palabras clave

núcleo pedunculo pontino; *substantia nigra pars compacta*; neurodegeneración; estrés oxidativo

Introducción. El núcleo pedunculo pontino (NPP) desempeña un papel esencial en el control motor. La literatura sugiere que el NPP participa en el inicio y progresión de la enfermedad de Parkinson, y que su degeneración temprana precede a la muerte de las neuronas dopaminérgicas. **Objetivos:** determinar el efecto de la lesión neurotóxica del NPP sobre la función motora, la homeostasis oxidante nigroestriatal y la expresión génica de proteínas responsables de la homeostasis dopaminérgica. **Métodos.** La ejecución motora se evaluó mediante las pruebas de la barra transversal, del cilindro y de la huella. Se estudiaron la actividad enzimática catalasa (CAT), colinesterasa (AChE AE) y las concentraciones de malondialdehído (MDA) y glutatión (GSH). Los estudios moleculares contemplaron la expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa (TH), transportador vesicular de dopamina (VMAT), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y transportador de dopamina (DAT). **Resultados.** Los estudios conductuales revelaron leves trastornos de la coordinación y cambios sutiles de la deambulación de las ratas con lesión pontina. Los estudios bioquímicos mostraron un incremento de la actividad CAT y de las concentraciones de MDA y GSH. Los estudios moleculares demostraron un incremento transitorio de la expresión nigral de BDNF y TH junto a una disminución de la expresión génica de VMAT y DAT.

Unilateral neurotoxic lesion of the pedunculo pontine nucleus: a good approach to the pre-symptomatic experimental model of Parkinson disease in rats

Keywords

pedunculo pontine nucleus; substantia nigra pars compacta; neurodegeneration; oxidative stress

ABSTRACT

Introduction. The pedunculo pontine nucleus (NPP) plays an essential role in motor control. Literature on the topic suggests that PPN participates in the onset and progression of Parkinson's disease (PD) and that its early degeneration precedes the death of nigral dopaminergic neurons. Objectives: to determine the effect of neurotoxic injury of PPN on motor function, nigrostriatal oxidative homeostasis and gene expression of proteins responsible for dopaminergic homeostasis. **Methods.** Motor performance was evaluated by beam, cylinder and footprint tests. Biochemical studies focused on catalase enzymatic activity (CAT), cholinesterase (AChE AE) and concentrations of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH). The molecular studies included the expression of tyrosine hydroxylase (TH) mRNA; vesicular dopamine transporter (VMAT), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and dopamine transporter (DAT). **Results.** Behavioral studies revealed slight coordination disorders and subtle changes in the walking pattern of rats with pontine injury. Biochemical studies showed an early increase in CAT activity as well as concentrations of MDA and GSH. Molecular studies demonstrated a transient increase in nigral expression of BDNF and TH together with a marked decrease in gene expression of VMAT and DAT.

INTRODUCCIÓN

El núcleo pedunculo pontino (NPP) ha sido considerado de importancia clave en la regulación de las funciones motoras que fallan en el curso de la enfermedad de Parkinson (EP).^(1,2) El conocimiento de que la degeneración pontina antecede a la degeneración nigral ha abierto las perspectivas al desarrollo de modelos experimentales de EP en etapa pre-sintomática a través de la lesión neurotóxica del NPP.^(3,4)

Diferentes estudios han evaluado el efecto de lesiones uni- y bilaterales del NPP en la actividad motora de las ratas, demostrándose que la lesión pontina produce disfunciones motoras sutiles, más evidentes cuando se incrementa la demanda de la tarea motora.⁽⁵⁻⁸⁾

Por otra parte, las células dopaminérgicas nigrales exhiben una actividad marcapaso que mantiene abiertos canales de Ca^{2+} $\text{C}_{\text{av}1,3}$ que sustentan una entrada ininterrumpida de Ca^{2+} al interior celular.⁽⁹⁾ Adicionalmente, la dopamina (DA) puede oxidarse y autooxidarse formando compuestos altamente citotóxicos. Estas condiciones biofísicas y neuroquímicas imponen un reto metabólico y energético a las neuronas nigrales que fluctúan entre la vulnerabilidad a eventos de estrés oxidativo que pueden conducir a la degeneración y el mantenimiento de la homeostasis dopaminérgica junto a su integridad morfo funcional.⁽⁹⁾

La literatura señala que la actividad nigral es modulada por señales colinérgicas pontino-nigrales mediadas por receptores colinérgicos.⁽¹⁰⁾ Se plantea que la modificación de las sinapsis colinérgicas incrementa la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a eventos de tipo oxidativo que activan programas de muerte celular.⁽¹¹⁾

Algunos estudios apoyan que la existencia de bajas concentraciones de glutatión (GSH), el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y el estrés oxidativo pueden ser parte de los mecanismos que subyacen a la muerte celular nigral en la EP.⁽¹²⁻¹⁴⁾ La condición de estrés oxidativo impone cambios en la transcripción y la señalización celular.⁽¹⁵⁾ Algunos de estos cambios pudieran ser adaptativos al nuevo escenario molecular y otros pudieran ser perjudiciales poniendo en riesgo la supervivencia celular.^(16,17) En este contexto, el estudio del efecto de la lesión del NPP en la expresión génica nigral de proteínas responsables del metabolismo y la homeostasis dopaminérgica como la tirosina hidroxilasa, el transportador vesicular y el transportador de dopamina, así como del factor neurotrófico derivado del cerebro, resulta muy interesante.

El objetivo general del presente trabajo fue determinar el efecto de la lesión neurotóxica del NPP sobre la función motora y el patrón de deambulación de las ratas, la homeostasis

oxidante nigral y la expresión génica de proteínas responsables de la supervivencia y mantenimiento del fenotipo dopaminérgico.

MÉTODOS

La ejecución motora se evaluó mediante las pruebas de la barra transversal, del cilindro y de la huella. Se estudiaron la actividad enzimática catalasa (CAT), colinesterasa (AChE AE) y las concentraciones de malondialdehído (MDA) y glutatión (GSH). Los estudios moleculares contemplaron la expresión del ARNm de la tirosina hidroxilasa (TH), transportador vesicular de dopamina (VMAT), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y transportador de dopamina (DAT).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios conductuales revelaron que las ratas con lesión NPP mostraban un incremento en la distancia y el tiempo de ejecución junto a una mayor desviación de la trayectoria en las barras de mayor dificultad. Asimismo, las ratas lesionadas mostraron una mayor asimetría en el uso de las extremidades anteriores en una tarea de exploración vertical y aunque la extremidad izquierda contralateral a la lesión no revela desuso, su utilización se subordina permanentemente al apoyo esencial que se realiza con la extremidad anterior derecha.

En lo que respecta al patrón de deambulación, la prueba de la huella reveló que las ratas lesionadas exhibían una disminución de la longitud de la zancada, la base de soporte y la distancia entre pasos. ^(18,19) De conjunto estos resultados sugieren alteraciones motoras sutiles, que se hacen notorias cuando se incrementa la complejidad de la tarea motora, lo que coincide con lo señalado por otros autores ⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. Ligeros trastornos del patrón de deambulación y de la coordinación motora son compatibles con las etapas pre motoras de la EP. ⁽²⁰⁻²²⁾

Desde el punto de vista bioquímico, nuestros resultados revelaron una actividad significativamente mayor de la enzima catalasa (CAT) en el tejido nigral de ratas con lesión NPP desde las 48 h posteriores a la lesión ($p \leq 0,05$), incremento que se hace muy significativo siete días posteriores a la lesión pontina ($p \leq 0,001$). Este último resultado, se acompaña de un incremento significativo de las concentraciones de malondialdehído (MDA) en el tejido nigral de las ratas con lesión NPP ($p \leq 0,001$). ⁽¹⁸⁾ El incremento de la actividad CAT sugiere un incremento en las concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) quien representa el sustrato de la enzima. ⁽²³⁾ Mientras tanto el aumento posterior de las concentraciones

de MDA indica la ocurrencia de eventos de peroxidación lipídica con el consiguiente daño a las membranas celulares. ⁽²⁴⁾ Lo interesante es que, aunque la literatura ha sugerido menores concentraciones de glutatión (GSH) en la SNpc, ⁽²⁵⁾ nuestros resultados demuestran un incremento transitorio y ligeramente significativo de este péptido antioxidante lo que sugiere su participación en los procesos iniciales detoxificación celular en condiciones agudas de estrés oxidativo. ⁽¹⁹⁾ Globalmente estos resultados apuntan a un compromiso de la homeostasis oxidante nigral asociado a la lesión neurotóxica unilateral del NPP lo que sugiere una mayor vulnerabilidad nigral en condiciones de degeneración pontina.

Los estudios moleculares revelaron un incremento transitorio (48h post lesión) y significativo ($p \leq 0,01$) de la expresión del ARNm del BDNF en el tejido nigral de ratas con lesión NPP. ⁽¹⁹⁾ Este resultado implica una importante contención y señal trófica que pudiera contribuir a retardar en alguna medida los cambios en la expresión génica de proteínas y enzimas responsables del homeostasis dopaminérgica, los cuales solo fueron evidentes 7 días posteriores a la lesión. Las ratas lesionadas mostraron un incremento significativo ($p \leq 0,05$) en la expresión génica nigral de la enzima TH junto a una disminución significativa de la expresión génica de VMAT2 ($p \leq 0,01$) y de DAT ($p \leq 0,001$), este último en tejido estriatal. ⁽²⁶⁾ La TH cataliza el paso limitante en la síntesis de dopamina, el incremento de su expresión parece concordar con una señal compensatoria de ajuste al escenario de estrés oxidativo por cuanto se le considera un sensor del estatus redox celular. ^(25, 27)

Por su parte la menor expresión de VMAT2 puede considerarse una señal de daño temprana que incrementa el riesgo de las neuronas dopaminérgicas a profundizar su condición de estrés oxidativo. ⁽²⁶⁾ Este hallazgo puede sugerir un menor empaquetamiento vesicular de dopamina y por ende mayores concentraciones de dopamina expuesta a los procesos de oxidación citosólica. ⁽²⁸⁾ Por último, menor expresión génica de DAT en tejido estriatal es compatible con las etapas pre sintomáticas de la EP y revela los intentos de la sinapsis nigroestriatal de mantener el estriado bajo control dopaminérgico. ⁽²⁹⁾ A largo plazo este cambio puede ser deletéreo por estimular los procesos de oxidación extracelular de la dopamina con la consiguiente activación de la microglía circundante. ⁽³⁰⁾ Desde el punto de vista morfológico estos cambios moleculares acontecen sin una traducción morfológica evidente pues al menos siete días posteriores a la lesión NPP, no se aprecian diferencias significativas en la comparación de la densidad de células TH⁺ entre ratas lesionadas y controles.

Conclusiones

La lesión neurotóxica del NPP produce daños sutiles de la coordinación motora, el balance estático y dinámico y el patrón de deambulación, todos compatibles con las etapas pre motoras de la EP. El compromiso de la proyección pontino-nigral promueve cambios neuroquímicos que conllevan a eventos de estrés oxidativo a nivel nigral junto a modificaciones tempranas en la actividad antioxidante nigral y cambios en las funciones enzimáticas de neuromodulación. La lesión neurotóxica unilateral del NPP se acompaña de cambios en la expresión génica de proteínas y enzimas que sustentan la homeostasis dopaminérgica y que representan ajustes compensatorios o señales de daño temprano, todas factibles de manifestarse en etapas pre-sintomáticas de la EP.

El modelo de lesión neurotóxica unilateral del NPP representa un buen acercamiento a un modelo experimental de EP en etapa pre sintomática ya que sin dañar directamente ni la SNpc ni la proyección nigroestriatal, pone en marcha un grupo de eventos que incrementan la vulnerabilidad nigral a la neurodegeneración.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Javier Jimenez-Martin, Departamento de Fisiología de la Escuela de Ciencias Médicas de Otago, Universidad de Otago, Dunedin, Nueva Zelanda; a Maylin Wong Guerra, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) de Cuba; a Yanier Núñez Figueredo, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) de Cuba, y a Liliana Francis Turner, Facultad de Ciencias de la Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Müller ML y cols. Thalamic cholinergic innervation and postural sensory integration function in Parkinson's disease *Brain* 2013; 136:3282-3289.
2. French IT., Mathusamy KA. A Review of the Pedunculopontine Nucleus in Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 2018; 10:99-105.
3. Hernández-Chan NG y cols. Quinolinic acid lesions of the pedunculopontine nucleus impair sleep architecture, but not locomotion, exploration, emotionality or working memory in the rat. *Behav Brain Res.* 2011; 225: 482-490.
4. Bensaid M. y cols. Role of pedunculopontine cholinergic neurons in the vulnerability of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2016; 275:209-219
5. MacLaren DA. y cols. Deficits in motor performance after pedunculopontine lesions in rats – impairment depends on demands of task. *Eur J Neurosci.* 2014; 40:3224-3236.

6. Dunbar JS y cols. Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus of the rat. II. Examination of eating and drinking, rotation, and reaching and grasping following unilateral ibotenate or quinolinate lesions. *Brain Res.* 1992; 589:194-206.
7. MacLaren DA y cols. Updating of action - outcome associations is prevented by inactivation of the posterior pedunculopontine tegmental nucleus. *Neurobiology Learning Memory* 2013; 102:28-33.
8. Gut N y Winn P. The Pedunculopontine Tegmental Nucleus - A Functional hypothesis from the comparative literature. *Mov Disord.* 2016; 31(5):615-624.
9. Surmeier DJ. y cols. The Origins of Oxidant Stress in Parkinson's Disease and Therapeutic Strategies. *Neuroscience* 2011; 198:221-231.
10. Rizzi G y Tan KR. Dopamine and Acetylcholine, a Circuit Point of View in Parkinson disease. *Front. Neural Circuits* 2017; 11:110. doi: 10.3389/fncir.2017.00110.
11. De Sarno P. y cols. Muscarinic Receptor Activation Protects Cells from Apoptotic Effects of DNA Damage, Oxidative Stress, and Mitochondrial Inhibition. *The J Biol Chem.* 2003; 278(13):11086-11093.
12. Sofic E. y cols. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease *Neurosci Letters* 1992; 142:128-30.
13. Mosley RL. y cols. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's disease. *Clinical Neurosci Res.* 2006; 6:261-281.
14. Zhou Ch. y cols. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Mechanism of Pathogenic and Therapeutic Significance. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1147:93-104. doi:10.1196/annals.1427.023
15. Rodriguez-Sabate C. y cols. Parkinson's disease as a result of aging. *Aging Cell* 2015; 14:293-308. doi: 10.1111/accel.12312.
16. Chadwick W. y cols. Minimal Peroxide Exposure of Neuronal Cells Induces Multifaceted Adaptive Responses *PLoS ONE* 2010; 5:e14352. doi: 10.1371/journal.pone.0014352.
17. Huang YZ y McNamara J. Neuroprotective Effects of Reactive Oxygen Species Mediated by BDNF-Independent Activation of Trk B. *J. of Neurosci.* 2012; 32:15521-15532.
18. Jimenez-Martin J. Blanco-Lezcano L. y cols. Effect of neurotoxic lesion of pedunculopontine nucleus in nigral and striatal redox balance and motor performance in rats. *Neuroscience* 2015; 289:300-314.
19. Blanco L. y cols. Dysfunction and alterations in Glutathione concentration, Cholinesterase activity, and BDNF expression in Substantia nigra pars compacta in rats with pedunculopontine lesion *Neuroscience* 2017; 348:83-97.
20. Forsberg H y cols. Is parkinsonian gait caused by a regression to an immature walking pattern? *Adv Neurol.* 1984; 40:375-379.
21. Baltadjieva y cols. Marked alterations in the gait timing and rhythmicity of patients with de novo Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 2006; 24:1815-1820.
22. Rochester L. y cols. Cholinergic dysfunction contributes to gait disturbance in early Parkinson's disease. *Brain* 2012; 135: 2779-2788. doi:10.1093/brain/aws207.
23. Rice M. H₂O₂: a dynamic neuromodulator. *Neuroscientist.* 2011; 17(4): 389-406. doi:10.1177/1073858411404531.

24. Pomierny-Chamiolo y cols. Oxidative Stress Biomarkers in Some Rat Brain Structures and Peripheral Organs Underwent Cocaine. *Neurotox Res.* 2013; 23:92-102.
25. Meiser J. y cols. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal* 2013; 11:34. doi: 10.1186/1478-811X-11-34.
26. Blanco L. y cols. Tyrosine Hydroxylase, Vesicular Monoamine Transporter and Dopamine Transporter mRNA Expression in Nigrostriatal Tissue of Rats with Pedunculopontine Behav. *Sci.* 2018; 8,20; doi:10.3390/bs8020020
27. Dalton TP y cols. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu.Rev.Pharmacol. Toxicol* 1999; 39:67-101
28. Caudle WM. y cols. Reduced Vesicular Storage of Dopamine Causes Progressive Nigrostriatal Neurodegeneration. *The J of Neurosci.* 2007; 27(30):8138-8148.
29. Sossi V. y cols. Dopamine Transporter Relation to Dopamine Turnover in Parkinson's disease: A PET Study. *Ann Neurol.* 2007; 62:468-475.
30. Barcia C. Glial-Mediated Inflammation Underlying Parkinsonism. *Scientifica (Cairo)* 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/357805>.

Recibido: 20 de abril de 2020

Aprobado: 30 de mayo de 2020

Conflictos de interés. Los autores declaramos que no existen conflictos de interés en relación los resultados presentados.

Contribución de autoría

1. Conceptualización: Lisette Blanco Lezcano
2. Curación de datos: Esteban Alberti Amador
3. Análisis formal: Lisette Blanco Lezcano, María Elena González Fraguera, Mei-Li Díaz Hung
4. Adquisición de fondos: -
5. Investigación: Lisette Blanco Lezcano, Esteban Alberti Amador, María Elena González Fraguera, Bárbara Estupiñán Díaz, Teresa Serrano Sánchez
6. Metodología: Lisette Blanco Lezcano, Esteban Alberti Amador, Yamilé Vega Hurtado, Isabel Fernández Jiménez
7. Administración del proyecto: Lisette Blanco Lezcano
8. Recursos: -
9. Software: -
10. Supervisión: Lisette Blanco Lezcano
11. Validación: -
12. Visualización: Lisette Blanco Lezcano
13. Redacción – borrador original: Lisette Blanco Lezcano, Esteban Alberti Amador
14. Redacción – revisión y edición: Lisette Blanco Lezcano

Financiación. La investigación fue financiada en su totalidad por el presupuesto de investigaciones del CIREN.

