

MODELS DEGENERATIUS DE LA MALALTIA DE PARKINSON

SANTIAGO AMBROSIO I ANA ESPINO^(*)

Unitat de Bioquímica. Departament de Ciències Fisiològiques. Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona. ^()Ubicació actual: Servei de Neurologia. Mútua de Terrassa.*

Adreça per a la correspondència: Unitat de Bioquímica. Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició. Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona. Feixa Llarga, s/n. Hospitalet de Llobregat. 08907 Barcelona. Tel.: 402 42 81. Fax: 402 42 12. Adreça electrònica: Ambrosio@bellvitge.bvg.ub.es.

RESUM

Els models d'experimentació animals que més s'utilitzen com a aproximació a la malaltia de Parkinson consisteixen a provocar la degeneració de la via nigroestriatal per procediments químics. Els compostos que més s'han utilitzat en rosegadors són: la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que injectada estereotàcticament al feix nigroestriatal de la rata provoca la degeneració selectiva de les neurones dopaminèrgiques d'aquesta via, i la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que administrada perifèricament a ratolins provoca una pèrdua important i selectiva de la dopamina estriatal. En el nostre laboratori s'ha assajat en rates l'administració estereotàctica intraestriatal de la 6-OHDA i de l'MPP⁺, metabòlit tòxic de l'MPTP, amb la finalitat d'estudiar el procés neurodegeneratiu retrògrad. Ambdós compostos provoquen una important depleció inicial de dopamina estriatal, detectable per mesures del seu contingut tissular i per tècniques de microdiàlisi, i redueixen dràsticament l'activitat motora dels animals. El transport retroaxonal comporta, en el cas de la 6-OHDA, una pèrdua progressiva de dopamina estriatal i la destrucció de la substància negra. En el cas de l'MPP⁺, a diferència de la 6-OHDA, la substància negra no s'afecta significativament i els nivells estriatals de dopamina es recuperen parcialment. Amb MPP⁺, a diferència de la lesió amb 6-OHDA, tenim un efecte menys selectiu sobre neurones no dopaminèrgiques, sobre estructures no neuronals i sobre el metabolisme oxidatiu estriatal, probablement mediat per una sobreproducció de radicals hidroxils lliures. Les lesions estriatals provocades per l'MPP⁺ tenen, a més a més, una correlació amb la disminució de nivells d'àcid homovanílic en el líquid cefaloraquídi, tal com s'observa en les formes més avançades de la malaltia de Parkinson. En definitiva, les lesions químiques

del feix nigroestriatal, tot i no reproduir totes les característiques bioquímiques i les manifestacions de comportament de la malaltia de Parkinson, representen una eina eficaç per a l'estudi de les vies de connexió entre els ganglis basals i dels processos que poden conduir a la seva degeneració.

Paraules clau: malaltia de Parkinson, 6-hidroxidopamina, MPP⁺, dopamina.

SUMMARY

Animal experimental models of Parkinson's disease are usually get by chemical degeneration of nigrostriatal pathway. The most used compounds in rodents have been: 6-hydroxydopamine (6-OHDA), that stereotaxically injected in the nigrostriatal pathway produces the selective degeneration of dopaminergic neurons, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), that peripherically administered to mice causes an important and selective depletion of striatal dopamine. In our lab the stereotaxic intrastriatal administration of 6-OHDA and MPP⁺, the toxic metabolite of MPTP, have been assayed in rats with the aim to study the retroaxonal degenerative process. Both compounds caused a dramatic and fast dopamine depletion in the striatum, that can be measured by the tissue dopamine content and by microdialysis procedures, and both also greatly decreased the motor activity of the animals. In the case of 6-OHDA, the retroaxonal transport caused a progressive loss of striatal dopamine and a degeneration of substantia nigra. In the case of MPP⁺, the substantia nigra was not significantly affected and the dopamine striatal levels could be partly recovered. With MPP⁺, but not with 6-OHDA, we found a less selective effect on non-dopaminergic neurons, non-neuronal structures and striatal oxidative metabolism, probably mediated by an overproduction of free hydroxyl radicals. The striatal lesions caused by MPP⁺ have also a correlation with the decrease in homovanillic acid concentrations found in cerebrospinal fluid. In conclusion, the chemical lesions of nigrostriatal pathway, although does not reproduce all the biochemical and behavioural characteristics of Parkinson's disease, represent an effective tool to study the connection pathways between basal ganglia and the process that may lead to its degeneration.

Key words: Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, MPP⁺, dopamine.

Els símptomes cardinals de la malaltia de Parkinson són rigidesa, acinèsia, tremolors i anomalies posturals. Símptomes secundaris poden incloure alteracions neuropsiquiàtriques, com depressió, apatia i problemes cognitius. El nom de la malaltia és degut a James Parkinson, que el 1817 la va descriure per primer cop com a «paràlisi agitadora», per les dificultats motores que presentava associades a tremolors. Afecta

un 5 per 1.000 de la població amb edat superior a 40 anys, amb una incidència una mica superior en els homes (aproximadament 5 homes per cada 4 dones). La seva forma més comuna es coneix com a parkinsonisme idiopàtic, és a dir, d'origen desconegut, i afecta especialment persones entre 50 i 70 anys. No redueix gaire l'esperança de vida, però en redueix considerablement la qualitat fins a extrems invalidants.

La neuropatologia bàsica de la malaltia de Parkinson (MP) consisteix en una degeneració de les neurones d'una regió cerebral mesencefàlica que, per la seva pigmentació, s'anomena substància negra. Aquesta regió forma part d'unes estructures cerebrals que es coneixen en conjunt com a ganglis basals i que estan estretament vinculades amb el control, la programació i l'execució dels moviments. Els ganglis basals estan integrats per cinc estructures anatòmiques: el nucli caudat, el putamen, el globus pàl·lid, el nucli subtalàmic i la substància negra, interconnectades entre si per circuits de comunicació neuronal, amb les àrees associatives corticals, encarregades de decidir i iniciar els moviments, i amb el tàlem com a vestíbul de distribució d'ordres (Figura 1).

La substància negra conté els somes de bona part de les neurones dopaminèrgiques del cervell, concretament en una subregió que rep la denominació d'àrea A9 o zona compacta. Aquestes neurones es projecten majoritàriament cap al nucli caudat i putamen, àrees que es coneixen globalment com a nucli estriat i que en la rata són gairebé indistingibles. Aquestes vies de comunicació reben, per tant, el nom de vies nigroestriatals. A la vegada, de l'estriat surten neurones que utilitzen bàsicament com a neurotransmissors l'àcid γ -aminobutíric (GABA), juntament amb algun neuropèptid (Met-enkefalina o substància P). Els circuits de sortida de l'estriat projecten les seves terminacions en part cap al globus pàl·lid, i d'aquí cap al tàlem,

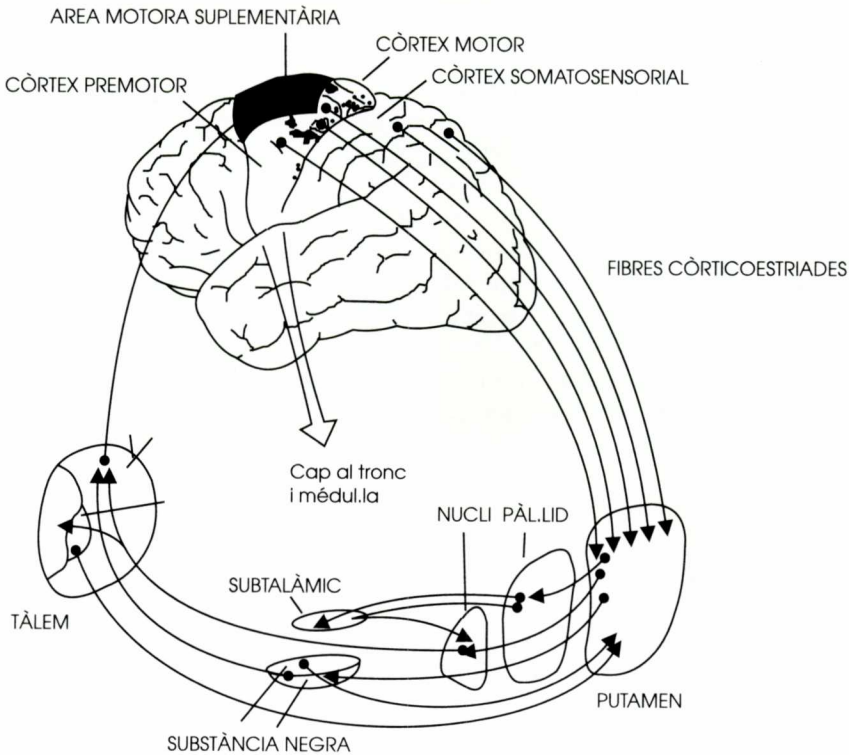


FIGURA 1. Circuit motor de decisió i control dels moviments. Connexions entre els ganglis basals.

i en part novament cap a la substància negra (via estriatonigral).

L'equilibri entre les vies nigroestriatals i estriatonigrals garanteix la correcta realització i coordinació dels moviments. Una disfunció en les vies nigroestriatals implica una activació de les vies estriatonigrals, que es tradueix en un alentiment dels moviments. Al contrari, una disfunció en les vies estriatonigrals implica una activació de les vies nigroestriatals amb l'aparició de moviments incontrolats, com els que es produeixen en la corea de Huntington.

En termes neuroquímics la MP està associada, doncs, a una disminució de l'activitat dopaminèrgica de la via nigroestriatal. En aquest sentit ha estat una de les primeres patologies neurològiques que s'ha pogut relacionar amb una alteració molecular concreta. Al començament dels anys seixanta, Ehringer i Hornykiewicz varen descriure que el contingut de dopamina en els nuclis estriatals dels malalts de Parkinson era menys d'un 5 % dels valors normals, especialment en el putamen. Als anys setanta Bernheimer i els seus col·laboradors varen establir per primer cop una relació entre l'expressió clínica de la malaltia i la deficiència de dopamina estriatal: mecanismes de plasticitat neuronal i de compensació metabòlica garanteixen un funcionament correcte dels ganglis basals fins que la concentració de dopamina estriatal es redueix per sota d'un 20 %, moment en què apareixen les primeres manifestacions clíniques. Així doncs, encara que en fases avançades de la MP també estan afectats els continguts d'altres neurotransmissors, com la noradrenalina o la serotonina, és clar que el dèficit de dopamina té un paper central en la gènesi i la manifestació clínica d'aquesta malaltia.

La dopamina és una catecolamina que es sintetitza a partir de l'aminoàcid tirosina per acció de la tirosina hidroxilasa i d'una descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics present

ales terminacions nervioses. Després d'exercir la seva acció sobre receptors específics, bona part de la dopamina és recaptada per les mateixes terminacions per ser reutilitzada, i la resta és metabolitzada per la monoaminoxidasa (MAO), enzim de presència mitocondrial, i per la catecol-O-metil-transferasa (COMT), enzim membranaral d'acció extracel·lular, i dóna lloc als metabò-

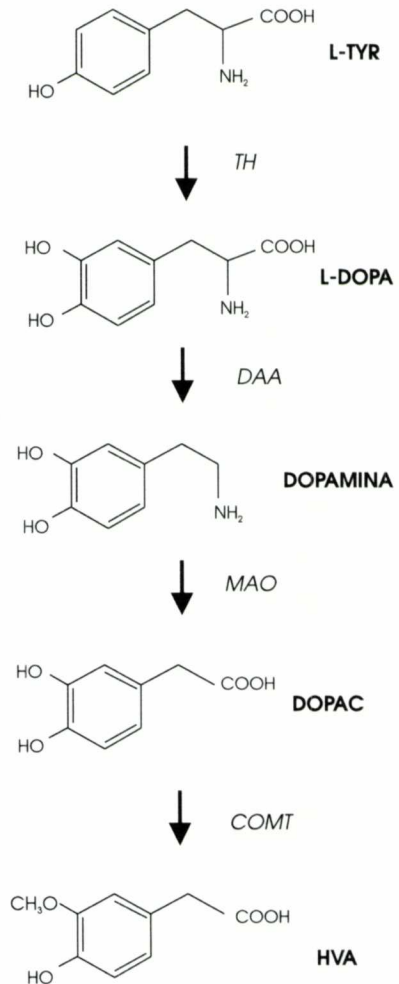


FIGURA 2. Síntesi i metabolisme de la dopamina. Per simplificació no s'indiquen les rutes alternatives que, a partir de DA, donen 3-metoxitiramina, per acció de la COMT, i finalment HVA, per acció de la MAO.

lits principals de la dopamina: l'àcid dihidroxifenilacètic (DOPAC) i l'àcid homovanílic (HVA). A la figura 2 es representa de forma molt simplificada la ruta de síntesi i metabolització de la dopamina, sense indicar les vies alternatives de la seva metabolització. D'aquesta manera la mesura del DOPAC pot ser indicativa del grau de metabolització de la dopamina, i la mesura de l'HVA pot ser indicativa del seu alliberament, mentre que la suma d'ambdós és indicativa del grau de recanvi dopaminèrgic. La dopamina, juntament amb altres catecolamines, com la L-dopa o la noradrenalina, pot oxidar-se i polimeritzar en algunes zones concretes del cervell, com la substància negra o el locus ceruli, i dóna lloc a l'anomenada neuromelanina, responsable de la pigmentació d'aquestes zones cerebrals.

La deficiència de dopamina en la MP no es pot suplir amb administració directa de dopamina exògena, ja que aquesta no travessa la barrera hematoencefàlica (BHE). En canvi, l'administració d'un precursor seu, com la L-dopa, que pot utilitzar un transportador d'aminoàcids aromàtics per travessar la BHE, va representar cap als anys seixanta un gran avenç en el tractament de la MP i en l'abordatge de les malalties neurològiques en general, ja que per primer cop es pal·liava una deficiència d'un neurotransmissor amb la seva compensació farmacològica. Avui, la L-dopa és encara el fàrmac més utilitzat per al tractament de la MP, a pesar dels considerables efectes adversos de la seva administració, com les discinèsies i els fenòmens «on-off» que tard o d'hora van associats al tractament.

Els intents de simular la MP en animals han estat nombrosos. Des que Charcot, al final del segle passat, va parlar de parkinsonisme en granotes induït per nicotina, s'ha intentat amb més o menys èxit reproduir en animals d'experimentació els símptomes i les característiques neuroquímiques i ana-

tomopatològiques de la malaltia de Parkinson. En realitat no es coneixen en animals malalties neurològiques comparables a la MP humana. Només en casos molt concrets s'han descrit símptomes parkinsonians en animals, com en el cas d'uns cavalls intoxicats per una ingestió excessiva d'un card de l'espècie *Centaurea solstitialis*, que desenvolupaven una incapacitat motora amb pèrdua de substància negra. Per reproduir, doncs, en animals d'experimentació les característiques d'un procés neurodegeneratiu com el que es dóna a la MP s'ha de recórrer a provocar les lesions desitjades per procediments físics o químics.

En rates i ratolins s'ha intentat sovint reproduir la pèrdua d'activitat dopaminèrgica de la via nigroestriatal per destrucció mecànica o electrolítica d'aquesta via, per depleció de la dopamina estriatal provocada per reserpina o per bloqueig dels receptors dopaminèrgics utilitzant fàrmacs neuroleptics. En tots aquests casos es pot obtenir una informació molt parcial i els models resulten bastant allunyats de la base fisiològica i bioquímica de la MP. Avui, com a models de MP s'utilitzen preferentment animals lesionats per administració de 6-hidroxidopamina, de MPTP o del metabòlit tòxic d'aquest darrer compost, l'MPP⁺.

La 6-hidroxidopamina és un anàleg de la dopamina que s'oxida fàcilment en contacte amb oxigen, i dóna lloc a quinones i radicals hidroxils (Figura 3). La seva similitud estructural amb la dopamina fa que pugui entrar en les neurones catecolaminèrgiques pels sistemes específics de recaptació. Un cop dins de les neurones, la 6-OHDA no és metabolitzada ni alliberada i la producció de radicals lliures d'oxigen condueix lentament a la inactivació de tots els mecanismes cel·lulars i, per tant, a la degeneració de la neurona (Cohen i Heikkila, 1974). A l'igual de la dopamina, la 6-hidroxidopamina no travessa la BHE i, per tant, s'ha d'adminis-

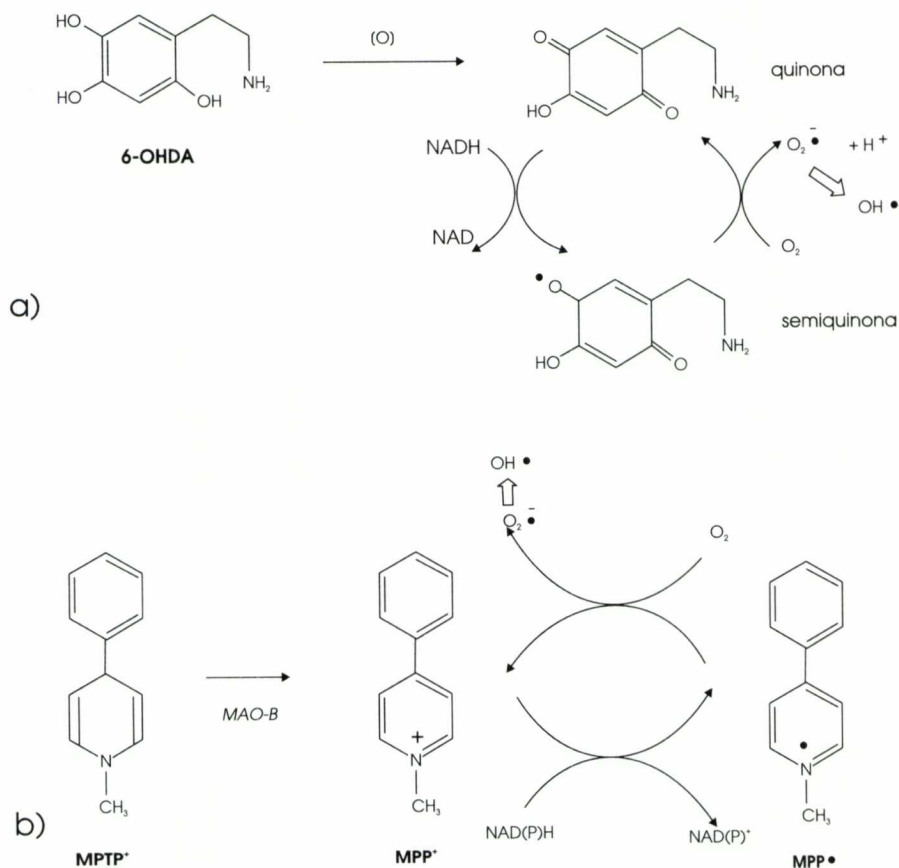


FIGURA 3. a) Estructura de la 6-hidroxi dopamina; b) estructura de l'MPTP i de l'MPP[•]. Hipotètics cicles redox responsables en ambdós casos de la generació de radicals OH.

trar intracerebrament. La seva aplicació en el tercer ventricle condueix a una afectació difusa de totes les neurones catecolaminèrgiques i per això no és gaire aconsellable com a model de la MP. La destrucció de la via nigroestriatal es pot aconseguir per administració estereotàctica en la substància negra de petits volums (entre 2 i 4 μ l) de solució fisiològica que continguin uns 6-12 μ g de 6-OHDA. De tota manera, la forma allargada de la substància negra fa que sigui difícil de lesionar completament amb una sola administració. La via nigroestriatal té la característica de presentar una forma d'embut amb el coll situat en una zona suprahi-

potalàmica coneguda com a *medial forebrain bundle* (MFB) (Figura 4). Al llarg del seu recorregut aquesta via presenta unes varicositats que garanteixen una discreta captació de la 6-OHDA en zones allunyades de les dendrites i de les terminacions. Es pot, doncs, aconseguir una destrucció gairebé total de la via nigroestriatal per administració de 6-OHDA a l'MFB. Atès que les àrees que envolten l'hipotàlem contenen força terminacions noradrenèrgiques, és convenient, per preservar aquestes neurones, tractar prèviament l'animal amb un blocador específic de la recaptació de noradrenalina, com la desipramina. Sol afegir-se també àcid as-

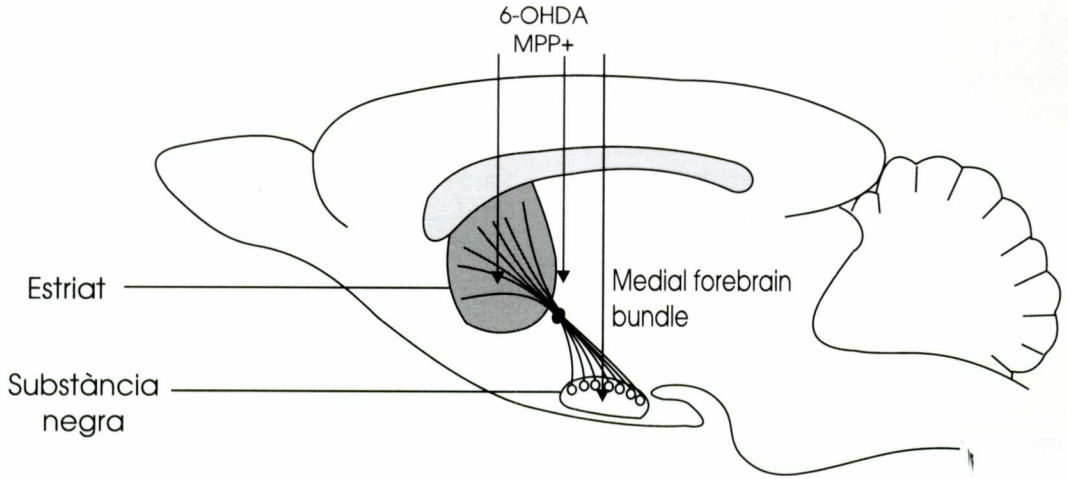


FIGURA 4. Via nigroestriatal en el cervell de ratna, que indica els possibles llocs d'administració de neurotoxines per a la seva degeneració química.

còrbic a la solució de 6-OHDA per evitar la seva ràpida oxidació. En 2 o 3 setmanes es pot aconseguir una pèrdua de dopamina estriatal superior al 80 % i una destrucció gairebé total de la substància negra.

En rates lesionades unilateralment amb 6-OHDA, tal com va descriure Ungerstedt per primer cop ja a l'any 1968, no s'aprecia cap hipocinèsia o rigidesa prominents però manifesten una postura anòmala característica, encorbada en posició de repòs cap al cantó lesionat. L'administració de compostos que estimulen l'alliberament de dopamina, com l'amfetamina, produeix un marcat comportament rotacional ipsilateral respecte al cantó de la lesió. D'altra banda, quan s'administren agonistes dopaminèrgics, com l'apomorfina, s'indueix un comportament rotacional contralateral al cantó de la lesió. Aquest efecte se suposa que és degut a l'estimulació dels receptors dopaminèrgics, hipersensibilitzats al cantó lesionat al cap d'unes tres setmanes després de la lesió.

La lesió bilateral amb 6-OHDA a la substància negra o a l'MFB provoca en els animals un quadre agut d'afàgia i adipsia que

en dificulta considerablement la supervivència. Els animals han de ser alimentats durant els primers dies amb administracions subcutànies de solució glucosada. En aquest model de lesió s'ha descrit disminució de l'activitat motora, rigidesa muscular i tremolors (Jolicœur *et al.*, 1991). L'administració d'agonistes dopaminèrgics, com l'apomorfina o la bromocriptina, compensa momentàniament la hipocinèsia, però l'administració d'amfetamina no té cap efecte, per la manca de terminacions dopaminèrgiques.

Al 1983 es publicava per primer cop l'existència d'una elevada incidència de parkinsonisme en una població de toxicòmans de Califòrnia que s'autoadministraven un narcòtic de fabricació casolana (per a revisió, Langston, 1986). Aquest preparat va demostrar-se que estava contaminat de forma important pel veritable causant del parkinsonisme: la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). El quadre clínic semblava del tot anàleg al manifestat en el parkinsonisme idiopàtic, els pacients responien bé al clàssic tractament amb L-dopa i, en els casos que varen morir per sobredosi, es va compro-

var la destrucció de la substància negra. L'MPTP administrat a primats per via parental (dosis d'1 mg/kg) reproduïa en aquests animals un sorprenent quadre de parkinsonisme, incloent-hi la destrucció de la substància negra, de manera que semblava haver-se trobat una correlació entre un hipotètic tòxic ambiental i la malaltia neurològica.

Malauradament el seu efecte en rosegadors va resultar molt menor. Els ratolins tractats amb MPTP (especialment els ratolins negres C57, amb dosis bastant superiors a les utilitzades en primats, uns 30 mg/kg) perdien, de forma bastant selectiva, aproximadament un 70% de la dopamina estriatal, però no mostraven cap manifestació de comportament clara que es pogués definir com a parkinsonisme. En el cas de les rates els resultats eren encara més descoratjadors, ja que dosis elevades de MPTP tenien abans un efecte perifèric que un efecte central i els animals arribaven a morir-se per depleció de la noradrenalina cardíaca sense gairebé cap afectació cerebral (Algeri *et al.*, 1987).

Cal explicar en aquest punt el que es coneix avui sobre els mecanismes d'actuació de l'MPTP, per tal d'intentar esbrinar els diferents efectes entre primats i rosegadors i fins a quin punt poden considerar-se aquests animals com a models de parkinsonisme (Bloem *et al.*, 1990). L'MPTP ha de ser metabolitzat per acció de la monoaminoxidas B (MAO-B) per exercir l'acció tòxica, i transformar-se en el metabòlit ionitzat MPP⁺ (Figura 3). La MAO-B és un enzim que és present bàsicament en els mitocondris de les cèl·lules glials del cervell, però molt poc en les neurones, especialment les neurones dopaminèrgiques, que utilitzen l'isoenzim MAO-A. Els dos isoenzims poden ser inhibits per MPTP i per MPP⁺, però només la forma B pot transformar l'MPTP en MPP⁺. Inhibidors específics de la MAO-B, com el deprenil, poden protegir contra l'efecte de l'MPTP, alhora que en el tractament de la

malaltia de Parkinson sembla que permeten reduir les dosis de L-dopa. Actualment s'està administrant deprenil de forma gairebé sistemàtica als pacients amb MP. El veritable causant de l'efecte tòxic de l'MPTP sembla ser, doncs, el seu principal metabòlit, l'MPP⁺. L'MPTP pot travessar les membranes plasmàtiques i creuar la BHE gràcies a la seva natura apolar. En canvi l'MPP⁺ no passa la BHE i per entrar dins de les cèl·lules necessita utilitzar un transportador de catecolamines. L'MPP⁺ mostra una afinitat especial pel transportador de dopamina, de manera que pot introduir-se dins la neurona dopaminèrgica (Figura 5). Això explica en bona part la selectivitat de l'efecte de l'MPTP sobre les neurones dopaminèrgiques, però no acaba d'explicar les diferències d'efecte entre primats i rosegadors, atribuïbles en part a la diferent relació entre MAO-A i MAO-B en els cervells corresponents i, en part, a uns mecanismes de desintoxicació força actius en les rates que no permeten que l'MPP⁺ s'acumuli en el cervell.

Així doncs, l'acció de l'MPTP/MPP⁺ comença per allà on hi ha uns mecanismes de captació de dopamina més actius, és a dir, a la terminació nerviosa. Un cop dins de la neurona, l'MPP⁺ pot internalitzar-se en les vesícules dopaminèrgiques o en el mitocondri, on inhibeix el complex I de la cadena respiratòria, la NADH-deshidrogenasa, i condueix a una aturada de la respiració cel·lular. Com a resultat la cèl·lula s'ofega: la producció d'ATP disminueix, l'oxigen es redueix només parcialment, es formen radicals lliures de l'oxigen que poden destruir el mitocondri i s'altera l'homeostasi en la terminació nerviosa, que acaba destruint-se (Singer i Ramsay, 1990). Si la neurona no reacciona suficientment, regenerant noves terminacions nervioses, la mateixa neurona acaba degenerant-se irreversiblement.

Quan l'MPP⁺ s'administra directament en la substància negra de les rates, s'aconse-

gueix la seva destrucció total, contràriament al que s'ha descrit sobre l'administració perifèrica de MPTP. Això corrobora que en realitat la rata no és immune a l'MPP⁺ i la seva resistència a l'MPTP ha d'estar associada als seus processos de metabolització. De la mateixa manera, quan l'MPP⁺ s'aplica estereotàcticament a l'estriat de la rata es produeix una marcada depleció de dopamina estriatal. Si l'aplicació és unilateral les rates adquireixen una torsió ipsilateral i una tendència a rotar cap al cantó corresponent a la lesió, fins i tot sense estimulació farmacològica. En aquests animals no s'observa però rotació contralateral amb apomorfina, com en el cas de la 6-OHDA. Les rates a les quals s'ha administrat bilateralment MPP⁺ presenten uns problemes aguts de mobili-

tat, afàgia i supervivència semblants als descrits per la 6-OHDA.

En el nostre laboratori vàrem estudiar l'efecte de l'administració intraestriatal de MPP⁺ a rates amb la doble finalitat de comprovar si les alteracions metabòliques que es produïen en el cervell podien ser comparables a les d'una situació d'hipòxia provocada pel bloqueig de la cadena respiratòria, i d'estudiar el curs temporal d'una lesió retrògrada com a possible model de lesions neurodegeneratives.

Un primer problema en l'administració estereotàctica intraestriatal està en l'accessibilitat de la droga a tota una estructura voluminosa com és l'estriat. L'administració d'un volum massa gran exerceix ella mateixa un efecte lesiu sobre les estructures

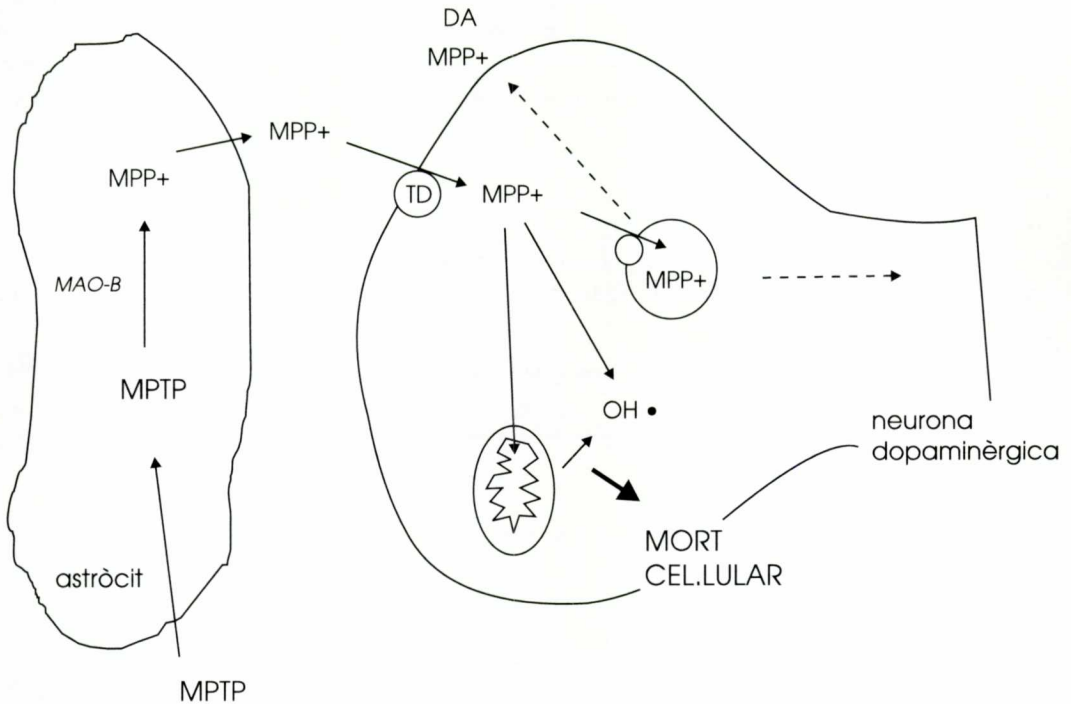


FIGURA 5. Esquema simplificat dels mecanismes de síntesi i acció neurotòxica de l'MPP⁺. L'MPP⁺ pot utilitzar els transportadors de dopamina (TD) per internalitzar-se en la neurona i en les vesícules dopaminèrgiques. Sota forma vesicular pot transportar-se retroaxonalment. Per mecanismes no ben establerts pot introduir-se en el mitocondri i bloquejar la cadena respiratòria.

cerebrals. L'administració de dosis concentrades en volums petits fa que hi hagi un gradient d'efecte radial des del punt d'injecció. L'administració múltiple de petites dosis en diferents punts de l'estriat fa que se sumin els efectes deguts a la lesió mecànica de l'agulla. Vàrem optar per una sola administració d'un volum de 4 µl al centre de l'estriat dret (coordenades: A:+ 0,7; L:+ 2,8; H:- 5 mm) amb una quantitat de MPP⁺ corresponent a 12 µg. La distribució de l'MPP⁺ a partir del punt d'injecció fa difícil saber quina concentració real rebien les diferents zones de l'estriat. El cert és que dosis menors no permetien observar un efecte global a l'estriat, i dosis gaire superiors tenien probablement efectes sobre altres estructures cerebrals, ja que dificultaven considerablement la supervivència dels animals.

Al cap de 48 hores de l'administració unilateral de MPP⁺, tal com s'indica a la taula I, els nivells d'ATP estriatal estaven reduïts a menys de la meitat i el lactat augmentat a més del doble, situació compatible amb una isquèmia o hipòxia cerebral (Espino *et al.*, 1994). D'altra banda, però, a la disminució d'ATP no corresponia un augment significatiu d'AMP, i els valors d'hexosafosfats i de fructosa-2,6-bisfosfat no feien

pensar en un augment de la glucòlisi com a conseqüència d'una situació d'hipòxia. Els nivells de dopamina i dels seus metabòlits estaven efectivament reduïts per sota d'un 50 %, però també estaven reduïts els nivells del neurotransmissor més abundant a l'estriat, el GABA.

L'estudi histològic ens va indicar que es produïa una marcada disrupció tissular a l'estriat, que començava a les poques hores amb unes cèl·lules inflades (*cellular swelling*) i acabava amb necrosi i cavitació cel·lular centrada en el punt d'administració, acompanyada d'una important i progressiva proliferació glial. En cap cas no es varen observar formes histològiques que fessin pensar en un fenomen apoptòtic (és a dir, nuclis fragmentats o destruïts amb membranes cel·lulars intactes) (Espino *et al.*, 1994).

Incubacions de talls tissulars d'estriat (seccions de 0,3 mm) ens van permetre posar en contacte tot el teixit estriatal amb diferents concentracions de MPP⁺ i comprovar així que l'efecte depletiu sobre la dopamina es produïa ja a concentracions baixes (25 µM), mentre que a concentracions superiors a 1 mM teníem un efecte poc específic, que es reflectia en una disminució de l'activitat glutamina sintetasa (força específica de les cèl·lules

TAULA I. Concentracions estriatals de neurotransmissors i metabòlits (nmol/g ± mes) després de l'administració de MPP⁺ (48 hores).

	Control	MPP ⁺ (12 µg)
Dopamina	50,4 ± 3,4	21,6 ± 1,5**
DOPAC	6,0 ± 0,6	3,4 ± 0,3**
HVA	3,8 ± 0,4	2,1 ± 0,2**
GABA	2219 ± 223	843 ± 84**
ATP	2260 ± 230	1100 ± 140*
AMP	140 ± 30	180 ± 60
Glucosa	1740 ± 500	3470 ± 310*
Hexoses-6-P	200 ± 20	130 ± 10*
Lactat	1730 ± 210	3940 ± 600**
Fructosa-2, 6-P2	7,2 ± 0,3	3,9 ± 0,6**

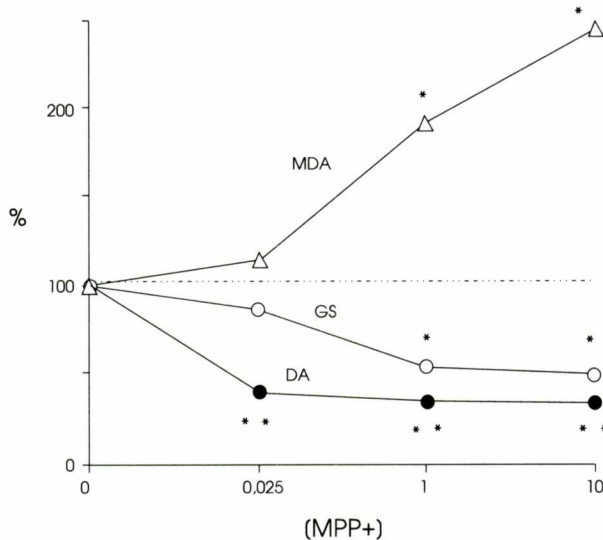


FIGURA 6. Decrement de la dopamina (DA) i de l'activitat glutamina sintetasa (GS) en tall estriatals incubats amb diferents concentracions de MPP⁺ (mM). Increment de la peroxidació lipídica (radicals OH) mesurat com a producció de malondialdehid (MDA) corresponent a la disminució de GS. *p < 0.05, **p < 0.01 respecte al temps 0 (test U-Mann-Whitney).

gials). Aquests estudis *in vitro* ens permetien observar també un augment de la peroxidació de membrana (producció de malondialdehid) associat a concentracions de MPP⁺ superiors a 1 mM (Figura 6). La peroxidació de membrana és un reflex de la producció de radicals lliures que, segons nosaltres, han de ser els causants de l'efecte inespecífic de l'MPP⁺. Sembla ser efectivament que l'MPP⁺ en solució aquosa i en presència tan sols d'un agent reductor com NAD(P)H (Adams *et al.*, 1993) pot donar lloc a un cicle redox amb producció de radicals (Figura 3b), mesurables a partir d'unes concentracions de MPP⁺ elevades.

En tractar intraestriatalment diferents rates amb dosis de MPP⁺ (12 µg) o de 6-OHDA (32 µg), que vàrem establir que causaven una lesió semblant, vàrem comprovar que la lesió produïda per l'MPP⁺ tant sobre la DA com sobre el GABA es recuperava parcialment però significativament amb el temps. En canvi, la lesió produïda per la 6-OHDA

d'entrada no disminuïa el contingut de GABA (que fins i tot resultava una mica augmentat, segurament com a conseqüència de la manca de dopamina) i resultava progressiva amb el temps (Figura 7).

El mateix efecte vam comprovar amb estudis de microdiallisi cerebral (Benveniste i Hüttemeier, 1990). Aquesta és una tècnica que es basa en la introducció en una zona del cervell d'una cànula d'uns 0,5 mm de diàmetre que conté al seu interior dos tubs de sílice, un d'entrada i un de sortida, i a l'extrem una membrana permeable a compostos de baix pes molecular (Adell i Artigas, 1991). Aquesta tècnica permet analitzar modificacions en el contingut extracel·lular de neurotransmissors o metabòlits, així com administrar algun compost intracerebrally i alhora estudiar-ne les conseqüències. Quan es fa una perfusió al nucli estriat amb MPP⁺ (10 mM), administrat mitjançant una cànula de microdiallisi, es produeix, de forma gairebé immediata, una gran depleció

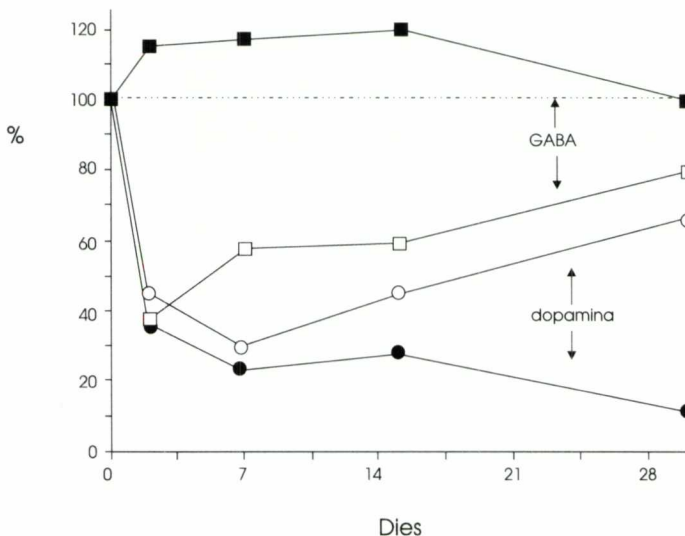


FIGURA 7. Contingut de dopamina (cercles) i de GABA (quadrats) estriatal després de l'administració intraestriatal de MPP⁺ (blanc) o de 6-OHDA (negre).

de dopamina que es pot analitzar en l'efluent de la cànula i que es manté durant un període aproximat de dues hores. El contingut extracel·lular dels metabòlits de la dopamina (DOPAC i HVA) és, en condicions basals, unes cent vegades superior al de la mateixa dopamina (aproximadament 250 nM en front d'uns 3 nM en les fraccions recollides, tenint en compte que el rendiment de la microdiàlisi per a aquests compostos està al voltant del 5%). Juntament amb la depleció de dopamina, com a conseqüència de l'administració de MPP⁺, es va detectar una disminució paral·lela de la concentració dels metabòlits, a causa de la pèrdua cel·lular de dopamina i a la inhibició de la MAO per l'MPP⁺. Quan es va fer una perfusió amb MPP⁺ als dos estriats d'una rata lesionada unilateralment 48 hores abans (amb MPP⁺ o amb 6-OHDA), el cantó no lesionat (esquerra) va respondre amb l'esperada depleció de dopamina, mentre que el cantó lesionat (dret) mostrava una resposta dràsticament menor.

Quan es va realitzar la mateixa prova al cap de dos mesos de la lesió unilateral, les rates lesionades amb 6-OHDA es continuaven comportant de la mateixa manera, en canvi, les rates lesionades amb MPP⁺ mostraven una depleció de dopamina bilateral molt semblant (Figura 8).

Quan al comportament, tant els animals lesionats amb MPP⁺ com els lesionats amb 6-OHDA mostraven una marcada disminució inicial de l'activitat motora, que es va mesurar utilitzant un sistema de laberints computeritzats. Al cap de dos mesos tan sols els animals lesionats amb 6-OHDA mantien una activitat motora reduïda (Espino *et al.*, 1995). Resultava, doncs, força evident que les lesions estriatals provocades per l'MPP⁺ es podien recuperar amb el temps, almenys parcialment (Espino *et al.*, 1995).

Per tècniques immunocitoquímiques es poden visualitzar les neurones catecolaminèrgiques utilitzant anticossos contra la tirosina hidroxilasa (antiTH). Per aquest pro-

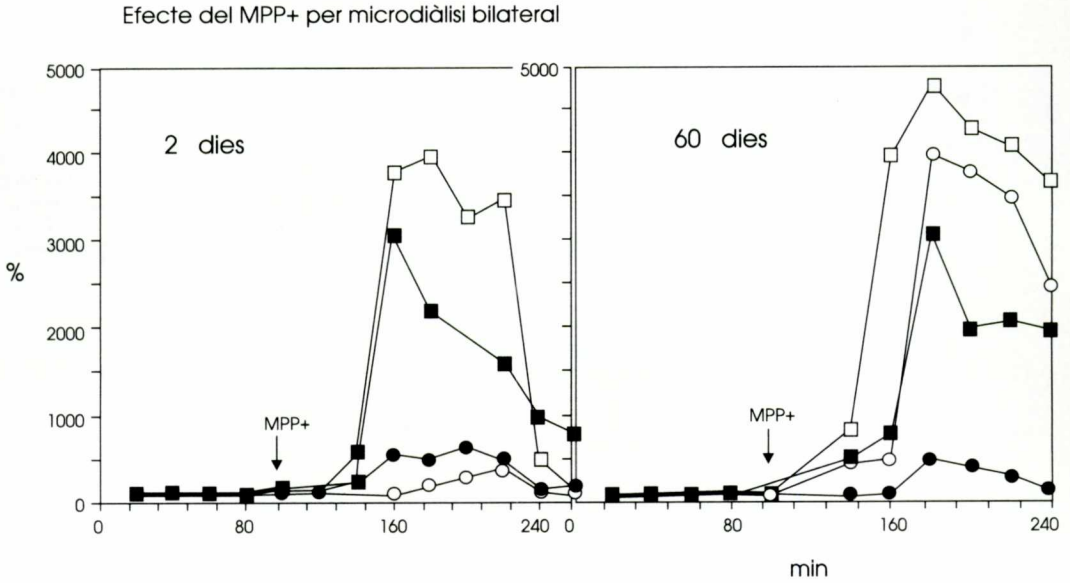


FIGURA 8. Microdiàlisi bilateral de rates lesionades unilateralment amb MPP⁺ (blanc) o amb 6-OHDA (negre) als 2 dies i als 60 dies després de la lesió. Depleció de dopamina estriatal provocada per MPP⁺ (10 mM) administrat per la cànula de diàlisi. Amb cercles es representa l'estriat dret (lesionat) i amb quadrats, l'estriat esquerre (no lesionat).

cediment vàrem comprovar que tant en ratolins C57 tractats intraperitonealment amb MPTP com en rates tractades intraestriatalment amb MPP⁺, a diferència del tractament amb 6-OHDA, no s'observava una clara destrucció de la substància negra. Així doncs, l'MPP⁺, tot i sent retrotransportat sota forma vesiculada cap al cos neuronal, no és capaç de destruir la substància negra en els rosegadors, contràriament al descrit en primats. Una possible explicació està en l'elevada afinitat de l'MPP⁺ pel transportador de dopamina vesicular (diferent del transportador plasmàtic), que permet preservar la cèl·lula contra l'efecte neurotòxic de l'MPP⁺ (Liu *et al.*, 1992). D'aquesta manera, les cèl·lules que proporcionalment contenen més vesícules catecolaminèrgiques

(com les cèl·lules cromafins) són més resistents a la toxicitat de l'MPTP/MPP⁺. Una clara diferència entre la substància negra dels primats i dels rosegadors consisteix en el grau de pigmentació, és a dir, en l'acumulació, bàsicament en els primats, dels polímers derivats de l'oxidació de dopa, dopamina i noradrenalina que constitueixen la neurome-lanina. L'MPP⁺ estableix un fort lligam amb la neuromelanina, que pot representar així un reservori de MPP⁺ no vesiculat que lentament, per producció de radicals lliures deguda al bloqueig de la cadena respiratòria o al propi cicle redox de l'MPP⁺, destrueix les neurones on s'ha acumulat.

Com tots els models d'experimentació el model amb MPP⁺ té, doncs, limitacions im-

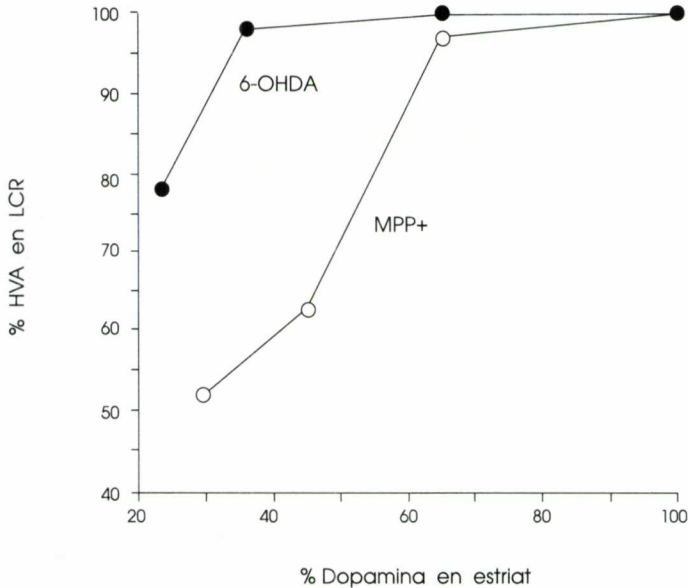


FIGURA 9. Correlació entre la disminució de dopamina a l'estriat i la disminució de HVA al líquid cefaloraquídi de rates lesionades bilateralment amb MPP⁺ o amb 6-OHDA.

portants: és poc selectiu i el dany ocasionat no és irreversible. A pesar d'això les seves aplicacions en el terreny de l'experimentació són importants. L'estudi dels seus mecanismes d'actuació ha permès de localitzar que, subjacent al parkinsonisme idiopàtic, hi ha una deficiència en l'activitat NADH-DH i que, implicada en la degeneració de la substància negra, hi ha una sobreproducció de radicals lliures, relacionada molt probablement amb la mateixa metabolització de la dopamina, implicant la MAO i processos oxidatius espontanis.

Com a procediment diagnòstic de la malaltia de Parkinson s'ha intentat sovint utilitzar la mesura de HVA present en el líquid cefaloraquídi (LCR) d'aquests pacients, ja que l'HVA, com a darrer metabòlit de la dopamina, és l'únic veritablement quantificable a l'LCR. Els resultats que es troben a la bibliografia són tremendament discordants i no aclareixen si veritablement l'HVA de l'LCR pot ser un paràmetre indicatiu de la gravetat de la lesió a la MP. En rates tractades bilateralment amb MPP⁺ nosaltres hem

pogut establir una correlació entre el grau de lesió estriatal i el contingut de HVA a l'LCR, correlació que no s'observa en lesions més específiques com les produïdes per 6-OHDA (Espino *et al.*, 1994, 1995) (Figura 9). Aquest fet sembla indicar que l'HVA a l'LCR es troba disminuït tan sols en aquells casos de parkinsonisme prou avançat en què la lesió ja és multisistèmica.

Una altra aplicació molt actual dels «models de parkinsonisme» per 6-OHDA o per MPP⁺, que estem utilitzant també en el nostre laboratori, consisteix a estudiar la implantació i supervivència de cèl·lules fetals amb el propòsit de reparar parcialment la lesió provocada o, potser més encara, d'estudiar el paper de factors tròfics en les connexions i el desenvolupament de les neurones, utilitzant com a medi hoste un cervell viu. Per a aquest propòsit, les cèl·lules que més interès tenen, i, per tant, més s'estan utilitzant són les cèl·lules fetals mesencefàliques, precursoras de les neurones dopaminèrgiques de la substància negra i d'altres nuclis catecolaminèrgics.

Es tracta de disseccionar les àrees mesencefàliques d'embrions de 14 dies de gestació (E14), segons el procediment descrit essencialment per Björklund i Dunnett (1992) i incubar-les a 37 °C en un medi de cultiu (DMEM carbogenat, enriquit amb glutamina) en presència de DNasa i tripsina per disgregar les cèl·lules. Després de repetits rentatges amb medi de cultiu, les cèl·lules es resuspenen en un volum de medi que garanteix una concentració aproximada de 100×10^6 cel/ml. La viabilitat d'aquestes suspensions cel·lulars, comprovada per fluorescència amb taronja d'acridina i bromur d'etidi, ha de ser superior al 90 % en el moment de la implantació. L'aplicació intra-estriatal de 3-4 µl d'aquesta suspensió (unes 400.000 cèl·lules) permet a una petita part d'aquestes cèl·lules (menys d'un 1 %) implantar-se i prosperar en el teixit hoste lesionat. Al cap de 3-4 setmanes es poden visualitzar en l'estriat neurones positives al marcatge amb antiTH, és a dir, neurones que estan fabricant catecolamines.

Si bé aquest procediment va semblar en un principi que podia representar una important alternativa terapèutica per al tractament de la malaltia de Parkinson (possibilitat que no s'ha descartat i que s'està assajant clínicament amb molta cautela), avui s'està utilitzant en gran part per estudiar els factors que intervenen en el restabliment de les connexions perdudes o en la preservació de les neurones en processos neurodegeneratius com la malaltia de Parkinson o altres malalties neurològiques.

Com a conclusió hem d'admetre que actualment no existeix un model experimental que estrictament reproduïxi en els rosegadors la malaltia de Parkinson. Es poden produir alteracions metabòliques, neuroquímiques i histològiques semblants a les descrites en la MP, es poden reproduir alguns dels símptomes cardinals motors en animals lesionats bilateralment, però en cap

cas no tenim un quadre global que reproduïxi totes les característiques de comportament, bioquímiques i anatomopatològiques de la MP. Aquest és un problema probablement inherent a totes les patologies neuropsiquiàtriques: el cervell de l'home i del rosegador tenen en el fons alguna diferència i la seva comparació es pot abordar experimentalment tan sols des d'un enfocament molt parcial. A pesar d'això la utilització d'aquests models experimentals ha resultat i resulta summament valuosa per a l'estudi del complicat entramat de connexions entre les vies mesoestriatals, per a l'estudi de la seva plasticitat sinàptica, i per a la recerca de tractaments terapèutics.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, J. D.; L. K. KLAIDMAN; A. C. LEUNG (1993). «MPP⁺ and MPDP⁺ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes». *Free Rad. Biol. Med.*, núm. 15, pàg. 181-186.
- ADELL, A.; F. ARTIGAS (1991). «Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo microdialysis study». *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, núm. 343, pàg. 237-244.
- ALGERI, S.; S. AMBROSIO; P. GAROFALO; P. GERLI (1987). «Peripheral effects of MPTP and its main metabolite MPP⁺ in the rat». *Eur. J. Pharmacol.*, núm. 141, pàg. 309-312.
- AMBROSIO, S.; A. ESPINO; B. CUTILLAS; R. BARTRONS (1996). «MPP⁺ toxicity in rat striatal slices: relationship between non-selective effects and free radical production». *Neurochem. Res.*, núm. 21, pàg. 73-78.
- AMBROSIO, S.; P. GERLI; C. PEREGO; S. ALGERI (1987). «Different toxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the nigrostriatal and mesolimbic pathways». *Eur. J. Pharmacol.*, núm. 133, pàg. 239-241.
- BENVENISTE, H.; P. C. HÜTTEMEIER (1990). «Microdialysis - Theory and application». *Progress Neurobiol.*, núm. 35, pàg. 195-215.
- BJÖRKLUND, A.; S. B. DUNNETT (1992). «Neural transplantation in adult rats». *Neural Transplantation*. Oxford: IRL Press. pàg. 57-78.
- BLOEM, B. R.; I. IRWIN; O. J. S. BURUMA; J. HAAN; R. A. C. ROOS; J. W. TETRUD; J. W. LANGSTON (1990). «The

- MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease». *J. Neurol. Sci.*, núm. 97, pàg. 273-293.
- COHEN, G. (1974). «The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxy radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents». *J. Biol. Chem.*, núm. 249, pàg. 2447-2452.
- ESPINO, A.; S. AMBROSIO; R. BARTRONS; G. BENDAHAN; M. CALOPA (1994). «Cerebrospinal monoamine metabolites and amino acid content in patients with parkinsonian syndrome and rats lesioned with MPP⁺». *J. Neural Transm. [P-D Sect]*, núm. 7, pàg. 167-176.
- ESPINO, A.; B. CUTILLAS; A. TORTOSA; I. FERRER; R. BARTRONS; S. AMBROSIO (1995). «Chronic effects of single intrastriatal injections of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium studied by microdialysis in freely moving rats». *Brain Res.*, núm. 695, pàg. 151-157.
- ESPINO, A.; J. LLORENS; M. CALOPA; R. BARTRONS; E. RODRIGUEZ-FARRÉ; S. AMBROSIO (1995). «Cerebrospinal dopamine metabolites in rats after intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium ion». *Brain Res.*, núm. 669, pàg. 19-25.
- ESPINO, A.; A. TORTOSA; G. BENDAHAN; R. BARTRONS; M. CALOPA; I. FERRER; S. AMBROSIO (1994). «Stereotaxic administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) decreases striatal fructose 2,6-bisphosphate in rats». *J. Neurochem.*, núm. 62, pàg. 1913-1920.
- JOLICOEUR, F.B.; R. RIVEST; A. DRUMHELLER (1991). «Hypokinesia, rigidity and tremor induced by hypothalamic 6-OHDA lesions in the rat». *Brain Res. Bull.*, núm. 26, pàg. 317-320.
- LANGSTON, J.W.; I. IRWIN (1986). «MPTP: current concepts and controversies». *Clin. Neuropharmacol.*, núm. 9, pàg. 485-507.
- LIU, Y.; D. PETER; A. ROGHANI; S. SCHULDINER; G. G. PRIVÉ; D. EISENBERG; N. BRECHA; R. H. EDWARDS (1992). «A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter». *Cell*, núm. 70, pàg. 539-551.
- SINGER, T.P.; R. R. RAMSAY (1990). «Mechanism of the neurotoxicity of MPTP». *FEBS Lett.*, núm. 274, pàg. 1-8.
- UNGERSTEDT, U. (1968). «6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons». *Eur. J. Pharmacol.*, núm. 5, pàg. 107-110.