

# Efecto neuroprotector de la administración sistémica de (-) nicotina en ratas hemiparkinsonizadas

✉ Lisette Blanco<sup>1</sup>, Lourdes Lorigados<sup>1</sup>, Rocío García<sup>1</sup>, Lisis Martínez<sup>1</sup>, Nancy Pavón<sup>1</sup>,  
María E González<sup>1</sup>, Teresa Serrano<sup>1</sup>, Vivian Blanco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Internacional de Restauración Neurológica, CIREN  
Ave. 25 No. 15805 e/ 158 y 160, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: lisette.blanco@infomed.sld.cu

<sup>2</sup>Centro Comunitario de Salud Mental  
Calle 1<sup>ra</sup>. No. 19606 e/ 10 y 12, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba

## RESUMEN

La manipulación del sistema colinérgico en el parkinsonismo experimental, a través de la administración de (-) nicotina, adquiere gran importancia a partir del hallazgo de una menor incidencia de la enfermedad de Parkinson (EP) en sujetos fumadores. Se evaluaron cinco grupos de ratas Wistar: 1. Ratas sanas (n = 11), 2. Ratas lesionadas en la *substantia nigra compacta* (SNc) (n = 10), 3. Ratas tratadas con (-) nicotina y lesionadas en la SNc (n = 18), 4. Ratas con falsa lesión de la SNc por inyección de solución salina fisiológica (SSF) (n = 10), 5. Ratas tratadas con SSF y lesionadas en la SNc (n = 10). Se evaluaron la coordinación y la asimetría motora, las concentraciones extracelulares de glutamato (Glu) y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en el núcleo pedunculopontino (NPP), la supervivencia de células en la SNc y la expresión estriatal de distintos factores neurotróficos. Las ratas tratadas con (-) nicotina y lesionadas en la SNc mostraron una mejor ejecución y un menor número promedio de errores en los puentes de mayores diámetros en comparación con las ratas hemiparkinsonizadas no tratadas con la droga. El tratamiento con (-) nicotina disminuyó las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP, atenuó la asimetría motora de las ratas, promovió más expresión estriatal del factor neurotrófico derivado del cerebro y hubo menos pérdida de células dopaminérgicas en la SNc. El esquema de administración de (-) nicotina en este estudio sugiere un efecto neuroprotector.

**Palabras clave:** (-) nicotina, ganglios basales, *substantia nigra compacta*, núcleo pedunculopontino

*Biotecnología Aplicada* 2008;25:117-125

## ABSTRACT

**Neuroprotective effect of the (-) nicotine systemic administration in hemiparkinsonian rats.** It is very important the manipulation of the cholinergic system in the experimental Parkinsonism through systemic (-) nicotine administration since the finding about the less incidence of Parkinson's disease between smoking people. The following experimental groups were evaluated: 1. non-treated rats (n = 11), 2. rats with lesion of the *substantia nigra compacta* (SNc) (n = 10), 3. rats treated with (-) nicotine and SNc lesioned (n = 18), 4. sham operated rats (n = 10), 5. rats with false pharmacological treatment and SNc lesioned (n = 10). The motor execution, motor asymmetry, extracellular concentration of glutamate (Glu),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in pedunculopontine nucleus (PPN), the survival of dopaminergic cells and the striatal expression of neurotrophic factors were the variables studied. The rats treated with (-) nicotine showed an improvement in the motor execution and a minor number of errors during the execution in the Cross Bridges Test in comparison with the hemiparkinsonian rats without pharmacological treatment. In addition, the pharmacological treatment induced a decrease in the extracellular levels of Glu and GABA in PPN and also it attenuated the motor asymmetry of the rats. Simultaneously, the (-) nicotine administration promoted a higher brain derived neurotrophic factor striatal expression joint to a survival of the dopaminergic cells in the SNc. Ours results suggests a neuroprotector role for the (-) nicotine schedule applied in the present study.

**Keywords:** (-) nicotine, basal ganglia, *substantia nigra compacta*, pedunculopontine nucleus

## Introducción

En la década de los sesenta se publicaron los hallazgos relacionados con la deficiencia dopaminérgica como aspecto distintivo de la enfermedad de Parkinson (EP), lo cual inició una promisoriosa etapa para el tratamiento farmacológico de esta afección con la administración de un precursor de la dopamina (DA), la L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) [1, 2]. Sin embargo, la levodopaterapia a largo plazo desencadena múltiples efectos indeseados, como movimientos involuntarios y fluctuaciones de la respuesta motora [3].

Diferentes alternativas farmacológicas han intentado restablecer el desequilibrio neuroquímico en los ganglios basales (GB), asociado a la degeneración de la vía ni-

groestriatal [4]. Las alternativas farmacológicas encaminadas a la neuroprotección que puedan prevenir la muerte de las células nigrales o enlentecer el curso degenerativo de esta enfermedad, han sido objeto de diferentes estudios en los últimos años [5-7].

Se ha enfatizado en el posible papel neuroprotector de la (-) nicotina para prevenir la degeneración de las células dopaminérgicas de la *substantia nigra compacta* (SNc), a partir del hallazgo de una menor incidencia de la EP en sujetos con hábito de fumar [8]. La nicotina es un alcaloide natural de la planta *Nicotiana tabacum*, que posee reconocidos efectos sobre el sistema nervioso central y periférico [9]. Aunque no se han dilucidado

1. Hornykiewicz O. Brain neurotransmitter changes in Parkinson's disease. In: Marsden CD, Fahn S, eds. Movement disorders. London: Butterworth Scientific, Movement Disorders 1982;3:41-58.

2. Jankovic J. Complications and limitations of drug therapy for Parkinson's disease. Neurology 2000;55 (12 Suppl 6): S2-6.

3. Obeso JA, Grandas F, Vaamonde J, Luquin MR, Artieda J, Lera G, et al. Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. Neurology 1989;39 (11 Suppl 2):11-9.

los mecanismos mediante los cuales la nicotina protege a las células dopaminérgicas, se plantea que la síntesis y liberación de factores neurotróficos, la liberación de dopamina estriatal a partir de las células que sobreviven a un daño neurotóxico, la promoción de eventos de señalización intracelular y la activación de los receptores nicotínicos, entre otros, pudieran ser los pilares de la neuroprotección que ejerce esta sustancia en la EP [10-14].

Mientras los estudios sobre la neuroquímica de los GB han aumentado en los últimos veinte años, los cambios que ocurren en otros núcleos como el pedunculopontino (NPP), anatómica y funcionalmente muy relacionado con los núcleos que conforman los GB, se han estudiado muy poco en el contexto de los modelos experimentales de la EP [15]. Se sabe que el NPP está conectado de forma recíproca con los GB y que envía proyecciones colinérgicas y glutamatergicas a la SNc, las cuales modulan la actividad dopaminérgica de las células nigrales [16]. Las conexiones del NPP con las redes interneuronas de la médula espinal a través del haz reticuloespinal, refuerzan la importancia de esta estructura en el procesamiento de la información motora [17].

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la administración sistémica de dopamina sobre los trastornos motores, la supervivencia de células dopaminérgicas en la SNc, la expresión estriatal de factores neurotróficos (FNT) y las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de ratas hemiparkinsonizadas.

## Sujetos experimentales

Para el estudio se trataron ratas Wistar, machos adultos con un peso entre 200 y 250 g, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. Se mantuvieron tres animales por caja durante todo el experimento, con ciclos de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad y acceso libre al agua y los alimentos. Para el trabajo experimental se tomó en cuenta la *Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales de experimentación*.

## Materiales y métodos

### Lesión de la SNc

Con la administración intraperitoneal (i.p.) de una solución de hidrato de cloral (420 mg/kg de peso), se anestesiaron las ratas y se colocaron en un equipo de cirugía estereotáctica para roedores (Stoelting, EE.UU.). Se inyectaron 3  $\mu$ L de una solución que contenía 8  $\mu$ g de 6-OHDA en 3  $\mu$ L de solución salina fisiológica al 0.9% (SSF) más 0.5 mg/mL de ácido ascórbico, a razón de 1  $\mu$ L/min en la SNc derecha, con las siguientes coordenadas estereotácticas (mm), de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson [18]: AP = -0.49, L = 0.17, DV = 0.81 (referentes a Bregma). La administración de igual volumen de SSF y en las mismas coordenadas, permitió conformar un grupo control de ratas falsa lesionadas.

### Actividad rotatoria

Un mes después de la inyección de 6-OHDA, se estudió la actividad rotatoria inducida por la D-anfetamina (5 mg/kg, i.p.). Con un Multicontador Electrónico LE

3806 acoplado a los sensores LE 902 (PanLAB, Barcelona, España) que determinaban el sentido de giro, en 90 min se determinó esta variable.

### Esquema de administración sistémica de (-) nicotina

Las ratas recibieron tres inyecciones subcutáneas (s.c.) de (-) nicotina (1 mg/kg de peso) cada 30 min. Finalizada la última aplicación se les inyectó la solución de la 6-OHDA. Este esquema de administración se repitió a los 7, 14 y 21 días de la inyección intracerebral de la neurotoxina 6-OHDA.

El grupo control de ratas recibieron el mismo esquema de administración de (-) nicotina, pero en lugar de la droga, se administró igual volumen de SSF.

### Exploración de la coordinación motora mediante la prueba de los puentes transversales

Para la prueba de los puentes transversales se mantuvieron condiciones de silencio e iluminación adecuadas. La evaluación fue por observación directa.

Las ratas se colocaron en un punto medio situado en un puente entre dos plataformas de escape a una altura de 60 cm de una superficie de apoyo. Cada ensayo duró 60 s y consistió en cuantificar el tiempo que demoraba el animal en alcanzar la plataforma (latencia de escape). La falla al alcanzarla o la caída del puente se consideraron como una latencia de 60 s (latencia de caída). Simultáneamente se cuantificó el número de errores en cada ensayo. Se consideró error: todo intento infructuoso de sujeción con las extremidades o con la cola o de mantenimiento del equilibrio, así como la caída del puente antes de los 60 s del ensayo. Se utilizaron puentes de sección rectangular y circular de 60 cm de longitud, que se colocaron en el siguiente orden: rectangular grande (2.5 cm de diámetro), circular grande (2.5 cm de diámetro), rectangular pequeño (1 cm de diámetro) y circular pequeño (1 cm de diámetro), que aumentaban paulatinamente la complejidad de la prueba. El estudio duró dos días consecutivos, y se hicieron tres ensayos diarios. Como latencia de escape y de caída, se tomó el valor promedio de los seis ensayos.

### Microdiálisis in vivo

La cánula guía se colocó en las coordenadas (mm) correspondientes al NPP derecho: AP = -8.00, L = 2.00, DV = 5.40 (referentes a Bregma) dos semanas después de los estudios conductuales. Los experimentos de microdiálisis cerebral se realizaron 24 h después del implante de la cánula guía.

La rata se acopló a un sistema de bomba de infusión de microdiálisis cerebral (CMA 100, CMA Microdialysis, Estocolmo, Suecia) y se infundieron las cánulas continuamente con una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa): 125 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L ácido ascórbico, pH 7.4 a 7.6 a un flujo de 2  $\mu$ L/min.

Se colectaron los dializados de forma manual una hora después de iniciado el proceso. Se tomaron seis dializados que se congelaron inmediatamente a -80 °C hasta su posterior análisis. Todos los experimentos se realizaron con las ratas despiertas.

4. Levi MS, Brimble MA. A review of neuroprotection agents. *Curr Med Chem* 2004;11(18):2383-97.

5. Fernández-Espejo E. Pathogenesis of Parkinson's disease: prospects of neuroprotective and restorative therapies. *Mol Neurobiol* 2004;29(1):15-30.

6. Hirsch EC. How to judge animal models of Parkinson's disease: prospects of neuroprotection. *J Neural Transm Suppl* 2006;70:255-60.

7. Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. Diagnosis and treatment of Parkinson's Disease: molecules to medicine. *J Clin Invest* 2006;116(7):1744-53.

8. Quik M, Kulak JM. Nicotine and nicotinic receptors: relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2002;23:581-94.

9. Martyn Ch, Gale Chh. Tobacco, coffee and Parkinson's disease. *BMJ* 2003;326:561-3.

10. Roceri R, Molteni R, Fumagalli F, Racagni G, Gennarelli M, Corsini G, et al. Stimulatory role of dopamine on fibroblast growth factor-2 expression in rat striatum. *J Neurochem* 2001;76:990-7.

11. Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Bickford PC, Tighe T, Sanberg PR. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci* 2002;71:2807-20.

12. Pimlott SL, Piggot M, Owens J, Greally E, Court JA, Jaros E, et al. Nicotine acetylcholine receptor distribution in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and vascular dementia: in vitro binding study using 5-[125I]-a-85380. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:108-16.

13. Quik M. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2004;27:561-8.

14. Miksys S, Tyndale RF. Nicotine induces brain CPY enzymes: relevance to Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2006;70:177-80.

15. Mena-Segovia J, Bolam JP, Magill PJ. Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci* 2004;27(10):585-8.

16. Rye D, Lee H, Saper C, Wainer B. Medullary and spinal efferents of the PPN tegmental nucleus and adjacent mesencephalic tegmentum in the rat. *J Comp Neurol* 1988;269:315-41.

17. Lee MS, Rinne JO, Marsden D. The pedunculopontine nucleus: its role in the genesis of movement disorders. *Yonsei Med J* 2000;41(2):167-84.

18. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, NY, 1998.

### Evaluación bioquímica. Análisis de los neurotransmisores. Cuantificación de los aminoácidos

Las concentraciones de aminoácidos en los dializados se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *high performance liquid chromatography*), acoplada a un detector de fluorescencia y derivatización con o-ftaldialdehído (OPA).

Se mezclaron 10  $\mu$ L de muestra con 10  $\mu$ L del agente derivatizante OPA (10 mmol/L de OPA disueltos en una solución tampón de 0.1 mol/L de tetraborato de sodio que contenía 77 mmol/L de ácido 3-mercaptopropiónico y metanol al 10%, pH 9.3). La mezcla se agitó en vórtex durante 15 s y la reacción se detuvo con ácido acético al 5% a los 45 s. De esta mezcla se inyectaron 20  $\mu$ L al cromatógrafo con una jeringuilla Hamilton. Los aminoácidos derivatizados se hicieron pasar por una columna de fase inversa (HR-80, de 8 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, ESA), con una precolumna de fase estacionaria similar, mediante una bomba cromatográfica isocrática (Philips PU 4100), y se detectaron mediante un detector de fluorescencia con una excitación igual a 340 nm y una emisión igual a 460 nm (Philips PU 4027). El registro de los cromatogramas se realizó mediante el programa CHROMATEPC, versión 4.24 (Philips). Para la separación de los aminoácidos se utilizó una fase móvil compuesta por  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 mol/L y metanol al 20%. Se analizó cada muestra por duplicado.

### Evaluación de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDG) y del factor neurotrófico derivado de la glía (FNDG)

#### A. Aislamiento de proteínas totales

Al concluir los tratamientos y evaluaciones, se anestesiaron las ratas con hidrato de cloral: 480 mg/kg de peso corporal, por vía i.p.) y se decapitaron. Se extrajeron sus cerebros y se lavaron con NaCl al 0.9% frío y se disecó el *striatum* (St). El tejido se congeló en nitrógeno líquido, se pesó y conservó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

Se extrajeron las proteínas del tejido estriatal mediante la técnica del TriPure. El tejido se homogenizó en 1 mL de solución de TriPure, se le adicionaron 0.2 mL de cloroformo y se obtuvieron tres fases. La fase inferior se trató con 0.3 mL de etanol absoluto para precipitar el ADN contaminante y obtener una muestra pura de proteínas. Posteriormente se adicionaron 1.5 mL de isopropanol para precipitar las proteínas totales. Se centrifugaron las muestras a  $4^\circ\text{C}$  y a 12 000 rpm durante 10 min, y se lavaron tres veces con tiocianato de guanidina (0.3 mol/L) preparado en etanol al 95%. Finalmente se lavaron las muestras con etanol absoluto, se centrifugaron en las condiciones descritas anteriormente y se resuspendió el precipitado en 0.2 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%.

#### B. Determinación de la concentración de proteínas

Se prepararon diluciones por duplicado 1:100 de cada muestra de proteínas en un volumen final de 0.1 mL. A cada una de las diluciones se les adicionaron 0.1 mL

de una solución que contenía 0.2 g de ácido bicinonílico en un volumen final de 5 mL, 0.2 mL de sulfato de cobre 4% y 5.2 mL de microreactivo A (7 g de carbonato de sodio anhidro, 1.6 g de hidróxido de sodio y 1.6 g de tartrato de sodio disueltos en 100 mL de agua destilada, pH 11.25). Las muestras se incubaron toda la noche a TA y se leyó la absorbancia a 540 nm empleando un espectrofotómetro (Shimadzu, Kyoto, Japón). La concentración de proteínas totales se calculó tomando como referencia una curva patrón obtenida a partir de diferentes concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina.

#### C. Western Blot

La inmunodetección del FNDG, FNDG y  $\beta$ -actina se realizó mediante la técnica de Western Blot. Esta última proteína se usó como control de la integridad de la muestra proteica. De cada muestra se tomaron 50  $\mu$ g de proteínas y se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. Para identificar las proteínas de interés se utilizó un patrón de peso molecular de color dual que incluía moléculas con pesos moleculares en el rango de 10 a 250 kDa (Bio-Rad, Richmond, VA, EE.UU.).

Una vez separadas las proteínas a 80 V, se transfirieron a una membrana PVDF (del inglés, *polyvinylidene fluoride*) (Bio-Rad, Richmond, VA, EE.UU.) durante 1 h. Los sitios inespecíficos se bloquearon con leche descremada al 5%, preparada en PBS-Tween al 0.05% durante 1 h a TA. Las membranas se incubaron toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  con anticuerpos primarios para FNDG (1:200), FNDG (1:200) y  $\beta$ -actina (1:300), preparados en solución bloqueadora. Estos anticuerpos fueron inmunoglobulina anti-FNDG y anti-FNDG producidas en conejo (policlonales), (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) e inmunoglobulina anti- $\beta$ -actina producida en ratón (monoclonal) (CINVESTAV, México). Al día siguiente se lavaron las membranas con PBS-Tween al 0.05% e incubaron con los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa (Zymed), preparados en solución bloqueadora, durante 1 h a TA. Como segundos anticuerpos para FNDG y FNDG se usaron antiinmunoglobulinas de conejo producidas en cabra y marcadas con peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) y para  $\beta$ -actina se utilizó una antiinmunoglobulina de ratón producida en cabra marcada con HRP (Zymed, CA, EE.UU.). Los anticuerpos secundarios para FNDG y FNDG se usaron a una dilución 1:2 000, mientras el anticuerpo secundario para  $\beta$ -actina se usó en una dilución 1:6 000. Las membranas se lavaron y se revelaron con el sistema de detección ECL (del inglés, *Enhanced Chemiluminescence*) (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Alemania).

Para cuantificar la expresión de los FNT, se digitalizaron las imágenes con el sistema BioDoc-It (Bio-Rad, Richmond, VA, EE.UU.). El análisis densitométrico se efectuó con el programa Lab Works 4.0 Image Acquisition.

Se utilizó la  $\beta$ -actina como control para normalizar la expresión de los factores neurotróficos, de manera que las densidades ópticas de FNDG y FNDG se expresaron en relación con la densidad óptica de  $\beta$ -actina. Para cada corrida electroforética se normalizaron los valores de FNDG y FNDG, normalizados sobre la ba-

se de  $\beta$ -actina, nuevamente sobre la base de uno. Cada muestra se analizó por triplicado.

### Evaluación de la pérdida de células dopaminérgicas

#### A. Obtención del tejido

Al concluir los estudios *in vivo*, las ratas recibieron una dosis mayor de hidrato de cloral (vía i.p., 480 mg/kg) y se perfundieron a través de la arteria aorta ascendente con 500 mL de NaCl al 0.9% y 500 mL de una solución fijadora de paraformaldehído al 4%, con glutaraldehído al 0.1%, ácido pícrico al 15% en fosfato de sodio 0.1 mol/L y pH 7.4. A continuación se extrajeron los cerebros, se conservaron en la solución fijadora durante 1 h, se lavaron con 0.1 mol/L de fosfato de sodio y pH 7.4, se crioprotectaron en sacarosa al 7, 15 y 30% (24 h a cada concentración) y se congelaron en nitrógeno líquido. Seguidamente se obtuvieron cortes coronales (20  $\mu$ M) de las áreas correspondientes a la SNc. Las secciones se montaron en láminas portaobjetos previamente recubiertas con gelatina-alumbre de cromo.

#### B. Procesamiento inmunohistoquímico

Las láminas con las secciones histológicas para la visualización de las células inmunorreactivas a la enzima TH se colocaron en PBS tres veces durante 7 min cada una. A continuación, las láminas se incubaron durante 20 min con solución de bloqueo y permeabilización (suero fetal de ternera al 20%, Triton X-100 al 0.25% en STF), se recubrieron con el anticuerpo anti-TH (1:100, STF suero fetal de ternera al 1% y Triton X-100 al 0.25%) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las láminas se lavaron en PBS tres veces durante 7 min y se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado durante 1 h (1:500, STF suero fetal de ternera al 1% y Triton X-100 al 0.25%). Después de tres lavados con PBS durante 7 min, las láminas se incubaron durante 1 h con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa de rábano, se lavaron con PBS y se revelaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato de la enzima y tetrahidrocloreuro de diaminobenzidina como cromógeno. Las secciones de tejido se deshidrataron utilizando una serie de alcoholes de concentraciones ascendentes, aclaradas en xilol y montadas en DPX.

Las ratas que mostraron una localización inadecuada de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA o de la cánula de microdiálisis cerebral, se excluyeron del análisis.

### Análisis de los datos

La prueba de normalidad a los datos se realizó por medio de la prueba de Kolmogorov Smirnov en todos los casos. Igualmente se probó la homogeneidad de varianzas mediante la Prueba de Levene.

La comparación de la latencia de escape, de caída, el promedio de errores cometidos por las ratas y las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP en los grupos experimentales, se realizó mediante un análisis de varianza de clasificación simple, seguido de una prueba de Tukey.

La actividad rotatoria inducida por D-anfetamina no siguió una distribución normal, por lo que la compa-

ración de esta variable en los grupos experimentales, se efectuó por medio de un análisis de varianza no paramétrico Kruskal Wallis, seguido de una prueba U-Mann Whitney.

Se trabajó con un nivel de significación de 0.05, y para el análisis de los datos se empleó el software *Statistica CSS*, versión 6.1.

## Resultados

### Estudio de coordinación motora: prueba de los puentes transversales

La latencia de escape en el puente de sección rectangular de 2.5 cm de diámetro solo mostró diferencias en los grupos controles (sanas y falsas lesionadas en la SNc) y en los grupos con lesión de la SNc (con tratamiento farmacológico y sin él) ( $p < 0.05$ ) (Figura 1A). No se evaluó la latencia de escape en los puentes de menores diámetros (1 cm) porque las ratas con lesión de la SNc (con tratamiento farmacológico y sin él) no completaron el tiempo de ejecución de la prueba.

La latencia de escape se evaluó en el puente de sección circular de 2.5 cm de diámetro, en el que hubo un incremento significativo tanto en el grupo de ratas con lesión de la SNc sin tratamiento con (-) nicotina ( $p < 0.01$ ) como en el grupo de ratas lesionadas que recibió tratamiento farmacológico ( $p < 0.05$ ), con respecto a los grupos controles (Figura 1A). Sin embargo, a pesar de este incremento en ambos grupos, la latencia de escape de las ratas con lesión de la SNc tratadas con (-) nicotina aumentó menos, lo que ubica a este grupo en una posición intermedia entre las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico y las ratas control (Figura 1A).

La latencia de caída se cuantificó en todos los grupos experimentales, excepto en las ratas sanas en el puente de sección rectangular de 2.5 cm. En el puente circular de (2.5 cm de diámetro no hubo diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ). En los puentes de 1 cm de diámetro, la latencia de caída de las ratas con lesión de la SNc (tanto las tratadas con (-) nicotina, como las no tratadas) mostró un comportamiento muy similar con una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto a los grupos controles (Figura 1B).

### Calidad de la ejecución motora

La observación directa de la calidad de la ejecución motora evidenció que las extremidades contralaterales a la lesión de las ratas inyectadas con 6-OHDA no tratadas con (-) nicotina, mostraron una ligera oscilación que balanceaba el cuerpo de la rata, sin impulsarlo hacia adelante, por lo que no participaron en el movimiento de avance. Este grupo de ratas no avanzó en línea recta sobre los puentes, sino que alternaron el movimiento rectilíneo con giros muy estrechos que las obligaron a adoptar posiciones cada vez más inestables, en la medida en que disminuyó el diámetro de los puentes (Figura 2A).

Las ratas tratadas con (-) nicotina, aunque también giraron espontáneamente en círculos estrechos, mostraron una menor disfunción de la extremidad posterior contralateral a la lesión de la SNc, lo que fue evidente en el apoyo de esta en el puente durante el reposo (Figura 2B) y la locomoción (Figura 2C).



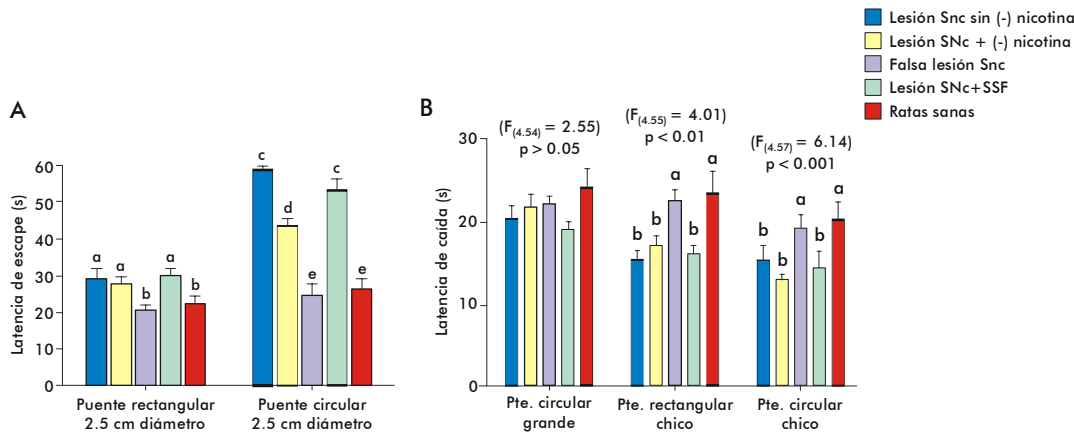


Figura 1. Efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina (1 mg/kg de peso, s.c.) en la latencia de escape y de caída de las ratas en la prueba de los puentes (Pte) transversales. A. Comparación de la latencia de escape en los puentes rectangular (F<sub>(4,59)</sub> = 5.13, p < 0.05) y circular (F<sub>(4,62)</sub> = 9.22 p < 0.01) de 2.5 cm de diámetro. Las letras en la parte superior de cada barra representan las diferencias entre los grupos a frente a b, p < 0.05, y c frente a d p < 0.05, c frente a e, p < 0.01. B. Comparación de la latencia de caída entre los grupos experimentales dentro de cada Pte. Las letras en la parte superior de las barras representan las diferencias entre los grupos a frente a b, p < 0.01. Grupos experimentales: ratas con lesión de la sustancia nigra compacta (SNc) sin tratamiento con (-) nicotina (n = 11), ratas con lesión de la SNc con tratamiento con (-) nicotina (n = 13), ratas con falsa lesión de la SNc (n = 11), ratas con lesión de la SNc con tratamiento con solución salina fisiológica (SSF) (n = 10), ratas sanas (n = 22). Las comparaciones se realizaron mediante un ANOVA de clasificación simple, seguido por una prueba de Tukey. Las barras representan X ± E.E.M.

Las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico y las ratas con lesión de la SNc que recibieron tratamiento con SSF en lugar de (-) nicotina, mostraron un incremento significativo del promedio de errores (p < 0.05), durante su desempeño en el puente de sección rectangular de 2.5 cm de diámetro. En este mismo puente, las ratas con lesión de la SNc tratadas con (-) nicotina mostraron un promedio de errores estadísticamente similar al de las ratas sanas. En el puente circular grande (2.5 cm de diámetro) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (p > 0.05). En los puentes de 1 cm de diámetro, todas las ratas con lesión de la SNc mostraron un aumento significativo en el promedio de errores (p < 0.05) en comparación con los grupos controles (sanas y falsa lesionadas de la SNc) (Figura 3).

**Estudio de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina**

El estudio de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina reveló una disminución significativa (p < 0.01) de la conducta de giro en las ratas tratadas sistémicamente con (-) nicotina en comparación con las ratas con lesión de la SNc sin tratamiento farmacológico, lo cual apunta al efecto positivo del tratamiento farmacológico que atenúa la asimetría motora (Figura 4).

**Evaluación del efecto de la aplicación sistémica de (-) nicotina en las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP y en la pérdida de células dopaminérgicas en la SNc**

**Estudio de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP**

El estudio de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA reveló una disminución significativa de ambas (p < 0.01) en el NPP de las ratas tratadas con (-) nicotina en comparación con las ratas lesionadas que no recibieron tratamiento farmacológico (Figura 5).

**Estudio de la pérdida de células dopaminérgicas en la SNc**

Los resultados del estudio inmunohistoquímico para la enzima tirosina hidroxilasa (TH) indicaron que el tratamiento farmacológico protege a las neuronas de la SNc de la lesión neurotóxica inducida por 6-OHDA, y se pudieron observar células TH+ que ocupaban las regiones medial y lateral de esta estructura (Figura 6A y B).

**Determinación del efecto de la aplicación sistémica de (-) nicotina en la expresión estriatal del FNDC y del FNDG**

Para la detección de la cantidad de proteína de FNDC y FNDG expresada en el St, se empleó la técnica de Western Blot. En todas las corridas electroforéticas se obtuvieron bandas de color intenso, bien delimitadas (Figura 7A). La detección y cuantificación de actina, proteína que se expresa constitutivamente en todas las células, permitió referenciar la concentración del FNT a los índices de expresión de proteínas en el St.

Los resultados indican que la lesión con 6-OHDA en la SNc de las ratas induce un incremento significativo (p < 0.01) tanto en la cantidad del FNDC como del FNDG expresado en el St, con respecto a los gru-



Figura 2. Errores más frecuentes durante la ejecución en la prueba de los puentes (Pte) transversales. A. Rata con lesión de la sustancia nigra compacta (SNc), que muestra una postura muy inestable durante el giro espontáneo. B y C. Rata tratada con (-) nicotina, apoyada en el Pte. rectangular grande sus dos extremidades traseras, en reposo en B y durante la ejecución de la prueba en C.

pos control sano y falso lesionado en la SNc (Figura 7B y C).

La administración sistémica de (-) nicotina, antes de la lesión de la SNc y 7, 14 y 21 días después produce un aumento significativo de la expresión estriatal del FNDC (Figura 7B). La expresión estriatal del FNDC en las ratas hemiparkinsonizadas que recibieron el tratamiento farmacológico se redujo a valores similares a los del grupo control sano (Figura 7C).

**Discusión**

**Efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina sobre los trastornos motores en ratas hemiparkinsonizadas**

Los resultados indican que el esquema de tratamiento sistémico con (-) nicotina aplicado promueve una mejoría motora en los animales: hubo una latencia de escape intermedia entre las ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron tratamiento farmacológico y las sanas, y un promedio de errores similar al de las ratas sanas para el puente rectangular de 2.5 cm de diámetro. No obstante, esta mejoría se pierde en los puentes de menores diámetros en los que la latencia de caída y el promedio de errores de las ratas tratadas con (-) nicotina no difiere de las ratas hemiparkinsonizadas sin tratamiento farmacológico. La administración sistémica de (-) nicotina redujo la asimetría motora, evaluada a través de la prueba de actividad rotatoria inducida por D-anfetamina.

Varios autores han propuesto un efecto neuroprotector de la exposición a nicotina sobre el sistema dopaminérgico, a partir de una relación inversa entre la adición a esta sustancia y la incidencia de la EP [19].

El esquema de administración de (-) nicotina aplicado en este estudio, aparece referido en la literatura como administración subcrónica, y coincide con el aplicado por otros autores para estudiar el papel neuroprotector de esta sustancia en modelos de EP por administración de agentes quelantes [20]. Específicamente en este esquema se suministró la (-) nicotina inmediatamente antes de la inyección de 6-OHDA con dos propósitos. El primero, para estimular tempranamente los mecanismos promotores de la liberación de FNT, y el segundo obedece a las propiedades antioxidantes de la (-) nicotina, que pudieran atenuar los efectos de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA [8, 21]. La literatura señala que aunque la (-) nicotina se inactiva muy rápido, una dosis de 1 mg/kg de peso administrado por vía subcutánea, puede cruzar la barrera hematoencefálica y alcanzar el cerebro en 8 s aproximadamente. Para estas condiciones se ha estimado una concentración intracerebral de 5 nmol/L de nicotina, que mantiene los receptores nicotínicos en un estado desensibilizado por alrededor de 8 h [22]. En este estudio las dos dosis siguientes administradas cada 30 min, intentan mantener y potenciar el efecto inicial. Se administraron dosis de refuerzo, siguiendo el mismo esquema de 7, 14 y 21 días después de la lesión de la SNc, para reforzar el efecto de la exposición a la droga [23, 24]. Estas últimas dosis mantienen el apoyo trófico y promueven la liberación de DA estriatal, con el propósito de suplir la deficiencia dopaminérgica asociada a la inyección de 6-OHDA [25-27].

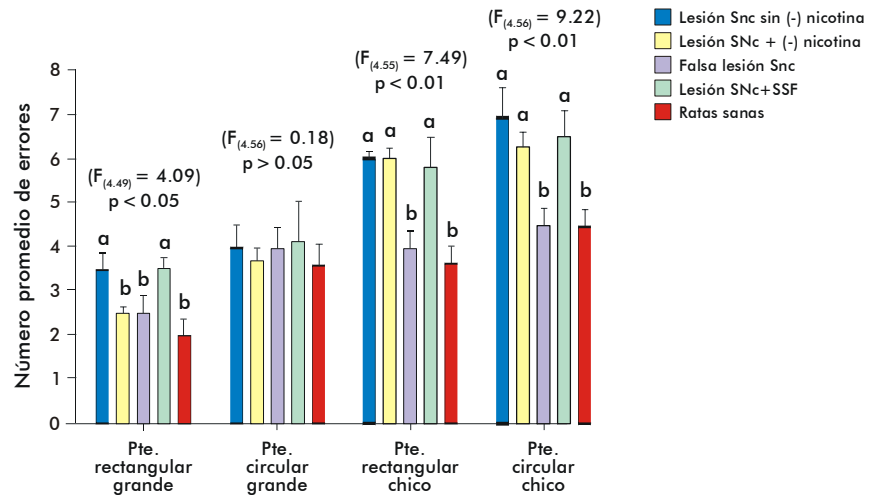


Figura 3. Comparación del promedio de errores cometidos en cada puente (Pte) transversal entre los grupos experimentales. Las letras diferentes en la parte superior de las barras representan diferencias significativas entre los grupos: a frente a b, p < 0.05. Grupos experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) sin tratamiento con (-) nicotina (n = 11), ratas con lesión de la SNc con tratamiento con (-) nicotina (n = 13), ratas con falsa lesión de la SNc (n = 11), ratas con lesión de la SNc con tratamiento con solución salina fisiológica (SSF) (n = 10), ratas sanas (n = 22). Las comparaciones se realizaron mediante un ANOVA de clasificación simple, seguido por una prueba de Tukey. Las barras representan X ± E.E.M.

En el estudio de la actividad motora con la prueba de los puentes transversales, todos los animales mostraron la típica secuencia alternante de movimiento con un acoplamiento diagonal que caracteriza a la locomoción cuadrúpeda [28]. No obstante, las ratas hemiparkinsonizadas mostraron un impedimento en el uso de los miembros contralaterales a la lesión, tanto para efectuar ajustes posturales como de marcha, lo que coincide con lo referido por otros autores [29]. Esta disfunción puede estar relacionada con la dificultad para transferir adecuadamente el peso del cuerpo y lograr un ajuste postural óptimo en menores superficies de apoyo [30].

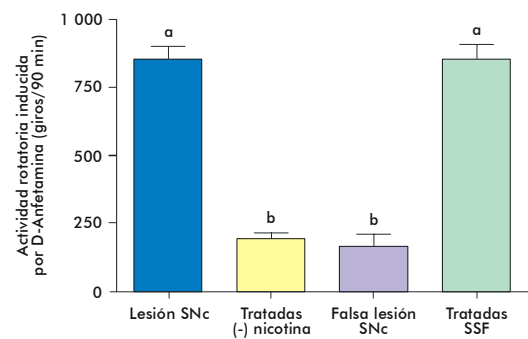


Figura 4. Comparación de la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (5 mg/kg de peso, i.p.) entre las ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n = 10), ratas tratadas con (-) nicotina y lesionadas en la SNc (n = 18), ratas con falsa lesión de la SNc (n = 10), ratas tratadas con solución salina fisiológica (SSF) y lesionadas en la SNc (n = 7). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas p < 0.001. La comparación se realizó mediante un ANOVA no paramétrico Kruskal Wallis ( $H_{(3,45)} = 31.82, p < 0.001$ ), seguido por una prueba U-Man Whitney. Las letras en la parte superior de las barras representan las diferencias entre los grupos: a frente a b, p < 0.001. Las barras representan X ± E.E.M.

19. Morens DM, Grandinetti A, Reed D, White LR, Ross GW. Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue?. *Neurology* 1995;45:1041-51.

20. Maggio R, Riva M, Vaglini F, Fornai F, Molteni R, Armogida M, et al. Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J Neurochem* 1998; 71:2439-46.

21. Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998;13:24-34.

Las observaciones en este trabajo sobre las modificaciones en el patrón de locomoción de las ratas hemiparkinsonizadas, en función de las características de la superficie de apoyo, coinciden con lo enunciado por otros autores [31, 32].

Se ha señalado que la deficiencia dopaminérgica estriatal es un impedimento para ejercer la fuerza necesaria para lograr el desplazamiento coordinado de todas las partes del cuerpo. Dicho impedimento puede estar relacionado con una incapacidad para dirigir los miembros afectados, con su rigidez, con la disminución de los reflejos u otras disfunciones sensorimotoras [33-35].

El tratamiento aplicado en este estudio tuvo un impacto positivo en la ejecución motora de las ratas, en los puentes de 2.5 cm de diámetro. En las ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con (-) nicotina se observó menos disfunción del miembro trasero contralateral a la lesión de 6-OHDA y una disminución del tiempo en alcanzar la plataforma en comparación con las ratas no tratadas. Esta mejoría puede sustentar la similitud del promedio de errores cometidos por las ratas tratadas con (-) nicotina y las ratas sanas en el puente rectangular de 2.5 cm de diámetro. No obstante, los resultados apuntan a que este efecto positivo se empobrece cuando los determinantes del soporte, del equilibrio y de la locomoción, como son la forma y el tamaño de la superficie de apoyo, toman valores críticos.

El tratamiento con (-) nicotina no previno la tendencia a girar espontáneamente en círculos estrechos, descrito en las ratas con lesión de la SNc. Esta conducta desequilibra aún más el centro de masa del cuerpo de la rata, lo cual puede adicionarse a la dificultad que impone el diámetro y la forma del puente [29]. En menores superficies de apoyo, la tendencia al giro acentúa la discapacidad motora y deriva en un fracaso de los intentos de sujeción y soporte [32].

Este mosaico de resultados sugiere que cuando el diámetro y la forma del puente se conjugan para alcanzar una complejidad máxima, el tratamiento sistémico con (-) nicotina aplicado en este estudio fracasa y no se obtiene una mejor ejecución motora de los animales. En estos casos predominan los trastornos motores asociados a la lesión neurotóxica de la SNc y las ratas exhiben un patrón conductual similar al del grupo de ratas hemiparkinsonizadas que no recibieron tratamiento farmacológico.

La menor asimetría motora que presentan las ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con (-) nicotina puede estar relacionada con la menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en la SNc de este grupo de ratas.

La literatura señala que las células dopaminérgicas nigrales sobrevivientes a la lesión neurotóxica pueden promover la liberación de DA de sus vesículas de almacenamiento bajo el efecto de la administración de D-anfetamina sistémica [36, 37]. El resultado neto sería un menor número de giros inducidos por este fármaco y, por ende, una menor asimetría motora.

Uno de los efectos atribuidos al papel neuroprotector de la (-) nicotina en la EP es la activación de los receptores colinérgicos nicotínicos presinápticos que se expresan sobre las terminales dopaminérgicas nigroestriatales intactas [13]. Se conoce que esta activación promueve la liberación de DA y que una pequeña

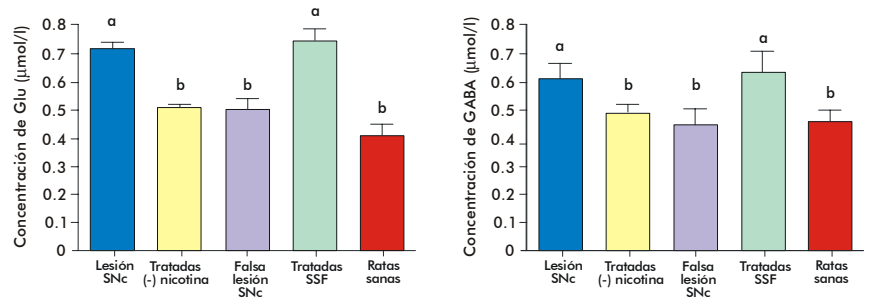


Figura 5. Efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina (1 mg/kg de peso, s.c.) en las concentraciones extracelulares de glutamato (Glu) y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en el núcleo pedunculopontino. A. Comparación de la concentración de Glu entre los grupos experimentales ( $F_{(4,39)} = 15.45, p < 0.001$ ). B. Comparación de la concentración de GABA entre los grupos experimentales ( $F_{(4,36)} = 2.96, p < 0.05$ ). Grupos experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (SNc) (n = 9), ratas tratadas con (-) nicotina y lesionadas en la SNc (n = 9), ratas con falsa lesión de la SNc (n = 6), ratas tratadas con solución salina fisiológica (SSF) y lesionadas en la SNc (n = 6), ratas sanas (n = 10). Las comparaciones se realizaron mediante un ANOVA de clasificación simple, seguido de una Prueba de Tukey. Las letras en la parte superior de las barras representan las diferencias: a frente a b,  $p < 0.01$ . Las barras representan  $X \pm E.E.M.$

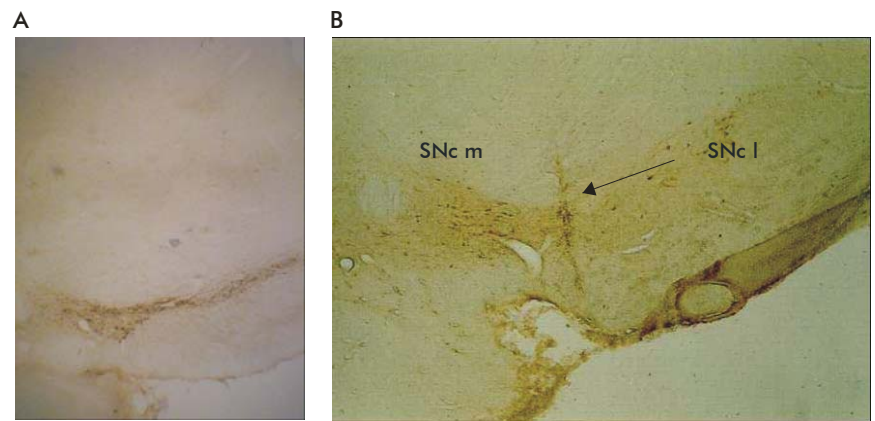


Figura 6. Microfotografía de la inmunodetección de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en un corte coronal de la *substantia nigra compacta* (SNc) de una rata tratada sistémicamente con (-) nicotina y lesionada en la SNc. A. Microfotografía (10X) del hemisferio derecho donde se observan células TH+ en toda la zona que abarca la SNc, a nivel de la coordenada AP = -4.4 (referente a Bregma). B. Microfotografía local (20X) donde se señalizan los cuerpos celulares dopaminérgicos en la SNc medial y lateral. La flecha indica el trazo de la aguja de inyección de la neurotoxina en la zona de la SNc. SNcm y SNcl: *substantia nigra compacta* medial y lateral, respectivamente.

cantidad de este neurotransmisor es suficiente para estimular los receptores dopaminérgicos estriatales [13, 38].

**Efecto del tratamiento sistémico con (-) nicotina sobre las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP**

La restauración de los valores normales de las concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP de las ratas hemiparkinsonizadas tratadas con (-) nicotina, pudiera responder a los efectos generales del tratamiento farmacológico, que previene el desequilibrio entre los sistemas de neurotransmisores de las dos vías del circuito motor de los GB. En el NPP convergen los impulsos gabaérgicos y glutamatérgicos procedentes de las vías "directa" e "indirecta" del circuito motor [15]. En consecuencia, cualquier cambio en el funcionamiento de estas repercutirá en la liberación de neurotransmisores en el NPP y, por ende, en la concentración de estos en su espacio extracelular [39].

22. Levin E. Nicotinic systems: an integrated approach. En: Levin ED, Ed. Nicotinic receptors in the nervous system. Londres, NY, Washington: Ed. Boca Raton, 2002:281-2.

23. Brust JCM. Substances with neurotoxic potential: nicotine. En: Spencer P, Schaumburg H, Ludolph A, Eds. Experimental and clinical neurotoxicology. NY, Oxford: Oxford University Press Ed. 2000:860-2.

24. Rowell PJ. Effects of nicotine on dopaminergic neurotransmission. En: Levin ED, Ed. Nicotinic receptors in the nervous system. Londres, NY, Washington: Ed. Boca Raton, 2002:51-80.

25. Jones IW, Bolam PJ, Wonnacott S. Presynaptic localisation of the nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunit immunoreactivity in rat nigrostriatal dopaminergic neurones. J Comp Neurol 2001;439:235-47.



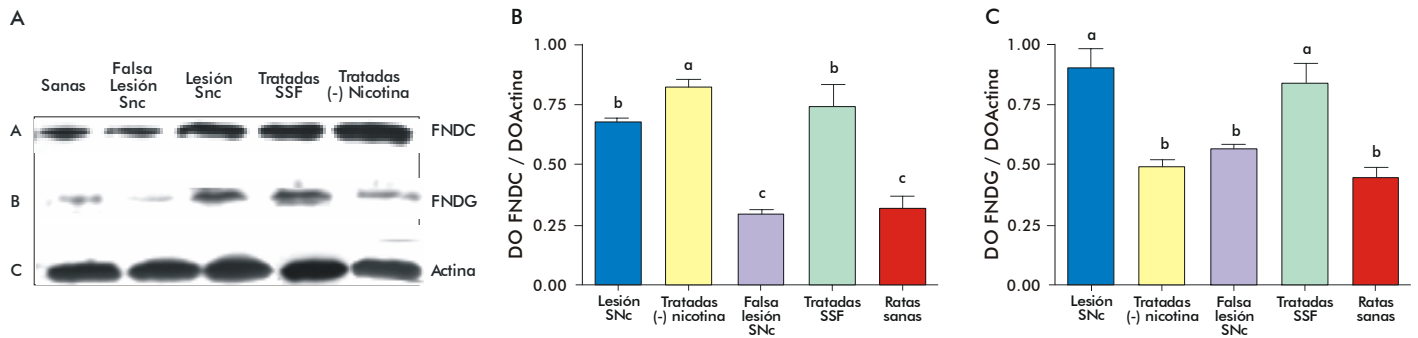


Figura 7. Comparación entre los grupos experimentales de la expresión estriatal de los factores neurotróficos, expresada mediante la relación de la densidad óptica (DO) de cada uno de los factores y la DO de la actina. A. Bandas correspondientes a la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), del factor neurotrófico derivado de la glía (FNDG) y de la proteína actina en el tejido estriatal de cada grupo experimental. B. Comparación de la expresión estriatal del FNDC ( $H_{(4, 18)} = 11.91$ ,  $p < 0.01$ ) entre los grupos. C. Comparación de la expresión estriatal del FNDG ( $H_{(4, 15)} = 11.91$ ,  $p < 0.01$ ) entre los grupos. Grupos experimentales: ratas con lesión de la *substantia nigra compacta* (Snc) sin tratamiento con (-) nicotina ( $n = 4$ ), ratas con lesión de la Snc con tratamiento con (-) nicotina ( $n = 4$ ), ratas con falsa lesión de la Snc ( $n = 3$ ), ratas con lesión de la Snc con tratamiento con solución salina fisiológica (SSF) ( $n = 4$ ), ratas sanas ( $n = 4$ ). Las comparaciones se realizaron por medio de un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba U-de Mann Whitney. Las letras en la parte superior de las barras en la figura 7B representan las diferencias: a frente a b,  $p < 0.01$  y en la fig. 7C representan: a frente a b,  $p < 0.05$ , b frente a c,  $p < 0.01$ , a frente a c,  $p < 0.001$ . Las barras representan  $X \pm E.E.M.$

El tratamiento con (-) nicotina puede dar paso a una mejoría de la actividad dopaminérgica cuyo sustrato, en este estudio sería la menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en la Snc medial y lateral. Las células dopaminérgicas supervivientes pudieran ejercer cierto control sobre el St y corregir en alguna medida el desequilibrio entre las vías del circuito motor. La (-) nicotina disminuye la actividad de las enzimas MAO-A y MAO-B relacionadas con el metabolismo de la DA [21]. Este efecto redundaría en una menor oxidación enzimática de la DA y menor estrés oxidativo de las células dopaminérgicas nigrales [21, 40]. La administración sistémica de (-) nicotina puede prevenir o atenuar esta cascada de eventos moleculares, cuyo resultado sería una menor pérdida de células dopaminérgicas en la Snc [41].

El esquema de administración empleado en este trabajo buscaba mantener los receptores colinérgicos nicotínicos centrales desensibilizados, entendida la desensibilización como una transición hacia un estado estable, cerrado, del receptor [27]. La literatura señala que los receptores nicotínicos aún desensibilizados mantienen una respuesta remanente a la nicotina que activa proteínas fosfatasa de la familia de la calcineurina [42]. Esta familia de proteínas actúa como sensores de alta afinidad, ya que se activan con muy bajas concentraciones intracelulares de calcio [42]. En condiciones fisiológicas, se mantiene un equilibrio entre las proteínas quinasas que actúan como sensores de baja afinidad (requieren una señal de calcio cuantitativamente superior) y las fosfatasas. En condiciones de desensibilización de los receptores nicotínicos, este balance se inclina a favor de las proteínas fosfatasas que desfosforilan sustratos proteicos y enlentecen o evitan el disparo de mecanismos de muerte celular [42].

El efecto de la (-) nicotina de propiciar una menor actividad de las enzimas MAO-A y MAO-B, así como el balance a favor de la actividad fosfatasa intracelular, pueden contribuir a la menor pérdida de células dopaminérgicas en la Snc de las ratas hemiparkinsonizadas y tratadas con (-) nicotina en este trabajo.

La restauración en alguna medida de la actividad dopaminérgica nigroestriatal pudiera tener dos apor-

tes fundamentales: corregir el incremento del tono glutamatérgico estriatal mediante el restablecimiento de la interacción DA-Glu a nivel estriatal, y restablecer la estimulación dopaminérgica sobre sus receptores estriatales [43]. Ambos efectos confluyen en la corrección del desequilibrio en el funcionamiento de las vías "directa" e "indirecta" del circuito motor y pueden ser parte de los mecanismos que expliquen la restauración de las concentraciones extracelulares normales de Glu y GABA en el NPP.

#### Efecto del tratamiento con (-) nicotina sobre la expresión estriatal de FNDC y FNDG de las ratas hemiparkinsonizadas

Los resultados demuestran que la lesión neurotóxica de la Snc provoca un aumento en la expresión estriatal de FNDC y FNDG. El esquema de tratamiento con (-) nicotina seguido propició un incremento aún mayor en la cantidad de FNDC expresado en el tejido estriatal, no así en el FNDG.

Uno de los mecanismos esbozados en la literatura para explicar los efectos beneficiosos del tratamiento sistémico con (-) nicotina sobre los síntomas parkinsonianos es el incremento en la expresión de FNT [20, 44, 45].

Maggio y cols. (1997) sugirieron que el efecto neuroprotector de la (-) nicotina en los modelos de EP pudiera basarse en activar mecanismos que modifican la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas al daño excitotóxico [44]. La activación de los receptores colinérgicos nicotínicos presentes en las células dopaminérgicas de la Snc genera la entrada de  $Ca^{++}$  a las neuronas, lo cual puede desencadenar la fosforilación de un grupo de proteínas quinasas, la transcripción de genes de respuesta temprana, la síntesis de nuevas proteínas y todo ello potenciar los mecanismos de la plasticidad sináptica y el remodelamiento neuronal [45].

Los resultados en lo que respecta al FNDC concuerdan con lo publicado en la literatura. Bustos y cols. (2004), señalaron un incremento tanto en la expresión del ARNm como en la cantidad de FNDC en el St de las ratas hemiparkinsonizadas [46]. Este hallazgo se ha relacionado con la activación de los receptores glutamatérgicos N-metil D-aspartato (NMDA) estriata-

26. Wonnacott S, Mogg A, Bradley A, Jones JJ. Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors: subtypes mediating neurotransmitter release. En: Levin ED, Ed. Nicotinic receptors in the nervous system. Londres, NY, Washington: Ed. Boca Raton 2002:29-50.

27. Wonnacott S, Sidhura N, Balfour DJK. Nicotine: from molecular mechanisms to behavior. Curr Opin Pharmacol 2005;5:53-9.

28. García Rill E. The Pedunculopontine Nucleus. Prog Neurobiol 1991;36:363-89.

29. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS Plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. Neuropharmacology 2000;39:777-87.

30. Johnston RE, Schallert T, Becker JB. Akinesia and postural abnormality after unilateral dopamine depletion. Behav Brain Res 1999;104:189-96.

31. Tillerson JL, Castro SL, Zigmond MJ, Schallert T. Motor rehabilitation use in a unilateral 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. Society Neurosciences Abstract 1998;25:672-78.

32. Miklyaeva EI, Martens DJ, Whishaw IQ. Impairments and compensatory adjustments in spontaneous movement after unilateral dopamine depletion in rats. Brain Res 1995;681:23-40.

33. Morgan M, Nomikos S, Huston JP. Behavioral analysis of asymmetries induced by unilateral 6-OHDA injections into the substantia nigra. Behav Neural Biol 1993;60:241-50.

34. Whishaw IQ, Castañeda E, Gorny BP. Dopamine and skilled limb use in the rat: more severe bilateral impairments follow substantia nigra than sensorimotor cortex 6-OHDA injection. Behav Brain Res 1992;47:89-92.

35. Whishaw IQ, Gorny BP, Tran-Nguyen LTH, Castañeda E. Making two movements at once: impairments of movement, posture and their integration underlie the adult skilled reaching deficit on neonatally-depleted rats. Behav Brain Res 1994;12:65-77.



les, ya que el FNDC controla la expresión de distintas subunidades de este receptor en células mesencefálicas en cultivo de una manera dosis-dependiente [47, 48]. Knott y cols. en el 2002 señalaron un incremento en la inmunorreactividad para el FNDC en asociación con la proteína ácida fibrilar glial en astrogliya y microglia ramificada en un estudio *post mortem* en el St y en la SNc de sujetos parkinsonianos [49].

Las neurotrofinas como el FNDC pueden ser sintetizadas por la glía. Un incremento en la actividad de esta molécula sugiere una respuesta glial a las señales originadas en las neuronas dopaminérgicas expuestas a un daño excitotóxico, oxidativo o de otra naturaleza [49].

En la literatura se reseña que la administración crónica y subcrónica de (-) nicotina a roedores provoca un aumento en la expresión del ARNm y en las concentraciones del FNDC, y el diseño de administración de (-) nicotina empleado en este trabajo, coincide con el de estos autores [44].

La normalización de la cantidad de proteína FNDC en el St de las ratas hemiparkinsonizadas tratadas con (-) nicotina observada en el presente estudio, pudiera estar relacionada con el esquema de administración subcrónica de (-) nicotina. Las publicaciones que refieren un incremento de esta variable, han contemplado esquemas de exposición crónica a esta sustancia

[50]. De cualquier modo, no se descarta un efecto neuroprotector del FNDC, aun con una cantidad de proteína similar a la de las ratas sanas. Eslamboli y cols. en el 2005 plantearon que la recuperación funcional de animales parkinsonizados puede resultar comprometida cuando se liberan altos niveles de FNDC con el uso de un vector lentiviral [51].

Los resultados mostrados sustentan el efecto neuroprotector del esquema de tratamiento con (-) nicotina seguido en el presente estudio, ya que promueve cambios en el modelo de hemiparkinsonismo, consistentes en estrategias de apoyo y locomoción similar a las de los animales sanos, en tanto el diámetro y la forma de la superficie de apoyo no constituyan un impedimento de orden crítico. En este modelo, las menores concentraciones extracelulares de Glu y GABA en el NPP pudieran contribuir a una mejor calidad en la transmisión de la señal motora con una activación más adecuada del patrón de movimiento muscular. El incremento en la cantidad de FNDC expresado en el St junto a una menor pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos, pudiera participar de los mecanismos que sustentan este efecto neuroprotector y atenuar el desequilibrio entre las vías "directa" e "indirecta" del circuito motor de los GB y contribuir a mantener cierto control dopaminérgico sobre la actividad estriatal

36. Calne DB, Zigmond MJ. Compensatory Mechanisms in degenerative neurologic diseases. *Arch Neurol* 1991;48: 361-3.

37. Zigmond MJ, Hastings TG, Perez RG. Increased dopamine turnover after partial loss of dopaminergic neurons: compensation or toxicity? *Parkinsonism Relat Disord* 2002;8: 389-93.

38. Smith ID, Sutton MA, Beninger RJ. Rotational bias in intact rats following intrastriatal injections of dopaminergic drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58(2):431-41.

39. Herrera-Marschitz M, You ZB, Gojny M, Silveira R, Godukhin OV, Chen Y, et al. On the origin of extracellular glutamate levels monitored in the basal ganglia of the rat by *in vivo* microdialysis. *J Neurochem* 1996;66: 1726-35.

40. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou NF, Benabid AL, Sadoul R, et al. Molecular pathway involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contributions to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;65:135-72.

41. Soto-Otero R, Méndez-Alvarez E, Hermida A, López AM, Labandeira JL. Effects of (-) nicotine and (-) conitine on 6-OHDA-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance

for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 2002;64:125-35.

42. Giniatullin R, Nistri A, Yakel J. Desensitization of nicotinic Ach receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci* 2005; 28(7):371-8.

43. Chase Th, Justin D. Striatal dopamine- and glutamate-mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *Trends Neurosci* 2000;23(10):86-90.

44. Maggio R, Riva M, Vaglini F, Fornai F, Racagni G, Corsini GU. Striatal increase of neurotrophic factors as a mechanism of nicotine protection in experimental parkinsonism. *J Neural Transm* 1997;104:1113-23.

45. Belluardo N, Mudó G, Blum M, Fuxe K. Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav Brain Res* 2000;113:21-34.

46. Bustos G, Abarca J, Campusano J, Bustos V, Noriega V, Aliaga E. Functional interactions between somatodendritic dopamine release, glutamate receptors and brain-derived neurotrophic factor expression in mesencephalic structures of the brain. *Brain Res Brain Res Search Rev* 2004;47: 126-44.

47. Campusano J, Tapia-Arancibia L, Bustos G. The expression of NMDA receptors subunit 1 and metabotropic glutamate receptors subtypes 1 and 3, is differentially modulated by BDNF and glutamate receptors agonist in mesencephalic cultures. *J Neurochem* 2001; 78(1):18-33.

48. Taylor S, Srinivasan B, Wordinger R, Roque RS. Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells. *Mol Brain Res* 2003;111:189-97.

49. Knott C, Stern G, Kingsbury A, Welcher AA, Wilkin GP. Elevated glial brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease nigra. *Parkinsonism Relat Disord* 2002;8: 329-41.

50. Sun M, Kong L, Wang X, Lu X, Gao Q, Geller A. Comparison of the capability of GDNF, BDNF or both, to protect nigro-striatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2005;1052:119-29.

51. Eslamboli A, Georgievska B, Ridley R, Baker H, Muzyczka N, Burger C, et al. Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2005;25(4):769-77.

Recibido en julio de 2007. Aprobado en junio de 2008.