

Efectos del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) sobre la conducta en un modelo experimental de Corea de Huntington en ratas

LILIANA FRANCIS-TURNER*, JORGE R. BERGADO ACOSTA**, JORGE BERGADO ROSADO***

* Grupo Modelos Experimentales Ciencias Zoológicas,
Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima.

** Universidad de La Habana.

*** Centro Internacional de Restauración Neurológica.

Resumen

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo que afecta a los ganglios basales. El uso de factores neurotróficos ha sido propuesto como posible tratamiento de esta enfermedad. El objetivo de nuestro estudio fue el de evaluar los efectos del factor de crecimiento neural (NGF) en el modelo de Huntington inducido por la lesión estriatal de ácido quinolínico (AQ). Para el estudio se utilizaron ratas las cuales fueron lesionadas con AQ (112mM, pH = 7,4) las cuales fueron tratadas con NGF, en diferentes tiempos en relación al día de la lesión: NGF 2 días antes de la inducción de la lesión (NGFQA), NGF simultáneo con la lesión (AQ+NGF) y NGF 2 días después de la lesión (QANGF). Los animales intactos y lesionados sin tratamiento sirvieron como grupos controles. Se realizaron estudios conductuales para evaluar los efectos de la lesión y del tratamiento sobre la memoria y aprendizaje espacial (laberinto acuático de Morris) y la actividad motora (rotación inducida por amfetamina). Los resultados de nuestro experimento demostraron que el NGF parece actuar de forma preventiva en la neuroprotección de poblaciones neuronales en el estriado demostrado en los estudios conductuales.

Palabras clave: Ácido quinolínico, asimetría motora, enfermedad de Huntington, laberinto acuático de Morris, NGF, rata.

Abstract

The Huntington disease is neurodegenerative pathology with affects the basal ganglia. The neurotrophic factors have been suggested as a possible treatment of the disease. The aims of our study were to increase our knowledge about the behavioral characterization of the Huntington models induced by quinolinic acid (QA) and the effects of nerve growth factor (NGF). In our work we used rats with unilateral lesion of striatum induced by AQ (112mM, pH = 7,4), which received NGF-treatment in different times in relation to the day of the lesion: NGF 2 day before the lesion (NGFQA), NGF simultaneously with QA (QA+NGF) and NGF 2 day after the lesion (QANGF). The intact and lesioned rats without treatment served as the control groups. The memory (Morris water maze) and motor activity (rotational behavior induced by amphetamine) were evaluated to study the effects of the lesion and treatment. Our results demonstrated that this early ap-

Correo electrónico: lilycolcub@telecom.com.co

plication of NGF has like preventives action in the neuroprotection of striatal population demostrated in behavioral results.

Key words: Huntington's disease, quinolinic acid, Morris water maze, motor activity, NGF, rat.

I. INTRODUCCIÓN

El deterioro de las funciones motoras y cognoscitivas es característico de procesos degenerativos como los que ocurren en la enfermedad de Alzheimer, de Huntington (EH), y el Parkinson. Los tratamientos médicos disponibles en la actualidad mejoran los síntomas generales de estas enfermedades pero no actúan en el ámbito de los mecanismos etiopatogénicos que provocan estas enfermedades.

La EH es un proceso neurodegenerativo y progresivo que se caracteriza por: degeneración severa de los ganglios basales (Sanberg y Coyle, 1984), movimientos coreiformes constantes e incontrolables desde el punto de vista conductual (DiFiglia, 1990), déficit cognitivo y trastornos emocionales (The Huntington's disease Collaborative Reserach Group, 1993). La región más afectada es el cuerpo estriado donde puede haber una pérdida de neuronas hasta de un 90%, con reducción de los niveles del ácido gamma-aminobutírico (GABA), y de las enzimas glutamato descarboxilasa (GAD) y colina acetil transferasa (ChAT).

Entre las excitotoxinas, el ácido quinolínico (AQ), presente en el cerebro humano ha demostrado ser uno de los agentes capaces de inducir los cambios neuropatológicos y neuroquímicos característicos de la EH, en modelos experimentales (Beal et al; 1991). Desde el punto de vista conductual, la inyección intraestriatal de AQ en primates no humanos induce movimientos coreiformes (Hamraye et al; 1991) e hiperactividad motora, y en ratas, déficit motor para la ejecución de algunas tareas (Block et al; 1993) y trastornos en las funciones cognitivas, demostrado por déficit en la ejecución de pruebas de evitación pasiva y de la memoria y el aprendizaje espacial (Schwarz et al; 1992).

Los Factores Neurotróficos (FNTs) son proteínas solubles capaces de regular la supervivencia, el crecimiento y la plasticidad morfológica de las neuronas; también, la síntesis de proteínas necesarias para algunas de sus funciones (Sport y Roberts, 1988), además de estimular procesos metabólicos generales y los mecanismos necesarios para la síntesis y liberación de neurotransmisores (Fallon y Loughlin, 1993).

El Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) fue el primer factor de la familia de las neurotrofinas identificado [10], y junto al Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (BDNF) y otras neurotrofinas (NT-3, NT4/5), está comprometido con el crecimiento y la supervivencia de varios tipos celulares, incluyendo las células del Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Dunnett, 1990) y el Sistema Nervioso Central (SNC) (1990).

Existen múltiples resultados que señalan la acción trófica del NGF sobre las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior, CBA (1993) y el cuerpo estriado (Chen et al., 1995; Maliah et al., 1995; Wilkler y Thal, 1995; Markowaka et al., 1994; Scout, 1995) estructuras que en los mamíferos desempeñan un papel importante en los procesos de

aprendizaje y memoria y en la coordinación del movimiento respectivamente (Mink, 1999). Además, se ha demostrado que la administración intracerebroventricular de NGF produce un incremento ostensible y selectivo de la actividad ChAT en el CBA en ratas recién nacidas y adultas (Mobley, 1985). Por otra parte, cuando es inyectado en el núcleo estriado, provoca incremento en la actividad de la ChAT, en el tamaño de las interneuronas colinérgicas (Gage, 1989) y tiene una acción directa sobre los procesos de memoria y aprendizaje, demostrado en pruebas conductuales (Francis-Turner y Valouskova, 1996).

La acción del NGF sobre la plasticidad sináptica fue demostrada por Bergado y cols. (1997) al observar que la infusión de NGF exógeno en ratas viejas con déficit cognitivo mejoró la potenciación sináptica a largo plazo a niveles comparables a los de ratas viejas sin déficit cognitivo, argumentando que estos efectos del NGF sobre la potenciación a largo plazo están relacionados directamente con la influencia trófica sobre la función colinérgica.

Más recientemente, Menei y cols. (2000) obtuvieron resultados muy alentadores utilizando células modificadas genéticamente para sintetizar NGF, en animales lesionados en el estriado con AQ, observando una disminución del daño en esta estructura de un 40% en comparación con animales lesionados no tratados. Tomando en cuenta éste y otros resultados ya mencionados, en este trabajo nos propusimos investigar la acción del NGF en un modelo de la EH, poniendo principal interés en las conductas de aprendizaje y memoria.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos experimentales

Se utilizaron 60 ratas (*Rattus norvegicus*) de la variedad Sprague-Dawley, machos, con peso entre 200 y 250g, obtenidas en el bioterio nacional Cenpalab. Fueron mantenidas en cajas plásticas de macrolon transparente (T-4), 5 animales por caja en condiciones de luz y temperatura controladas (ciclos de 12h luz y 12h oscuridad) y con libre acceso a comida y agua.

El laberinto acuático de Morris

Se utilizó para evaluar la memoria, el aprendizaje y la actividad motora. Utilizando entrenamientos repetitivos, el animal debe ser capaz de formar un mapa cognitivo que le permite ubicar la plataforma como única vía de escape del agua y aprende cómo llegar rápidamente a ésta desde cualquier parte de la piscina.

El laberinto acuático de Morris consistió en una piscina circular de 140 cm de diámetro y 60 cm de altura que se rellenó con agua a 20 °C hasta la altura de 30 cm. Una plataforma de acrílico transparente y de 11 cm de diámetro se coloca en el centro de uno de los cuatro cuadrantes imaginarios en que se divide el tanque y se mantiene 2 cm por debajo del nivel del agua no siendo visible desde la superficie. El tanque se situó en una

habitación iluminada con luz incandescente y existencia de señales extralaberínticas visibles desde la superficie. Además, se utilizó para evaluar las capacidades sensorimotoras mediante una prueba con plataforma visible.

Procedimiento

En la etapa de adquisición, los animales se entrenaron durante 3 días con 8 ensayos por días. Cada ensayo comenzó poniendo el animal dentro del tanque de cara a la pared del mismo en uno de los 4 puntos cardinales. Al animal se le permitió nadar libremente 1 min. como tiempo máximo. Si la rata no era capaz de encontrar la plataforma en este tiempo era guiada hasta la plataforma de escape y se le otorgaba de 15 a 30s de descanso sobre ésta, dándole la oportunidad de explorar todas las señales extralaberínticas para formar el mapa cognitivo que le ayude a resolver la tarea. Después del último ensayo, el animal fue secado y devuelto a su caja. El tiempo que necesita el animal para encontrar la plataforma (latencia de escape) fue registrado con ayuda de un cronómetro. En esta prueba de adquisición, la plataforma se mantuvo en el cuadrante Sudoeste.

Después de la prueba de adquisición, todos los animales que excedieron la latencia de 25s se excluyeron del experimento. El resto de los animales fueron designados al azar para formar cinco grupos experimentales:

1. Grupo lesionado con ácido quinolínico (AQ).
2. Grupo de falsos operados (Control).
3. Grupo con NGF previo, administración de NGF, 2 días antes de la lesión con AQ (NGFAQ).
4. Grupo con NGF simultáneo a la lesión (NGF&AQ).
5. Grupo con NGF tardío, 2 días después de la lesión (AQNGF).

Cirugía

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral 7% (0,6 mL/100g de peso corporal (p.c)) por inoculación intraperitoneal y colocados en el marco estereotáxico (David Kopf, USA). Primero se fijaron en el marco mediante las barras que se insertan y sujetan en las cavidades auditivas, de forma tal que se anuló el movimiento lateral; luego se anuló el movimiento vertical sujetando los incisivos y la nariz mediante la pinza nasal.

Se realizó una lesión unilateral del estriado medial (AP = -1,2 mm; ML = +2,8 mm; DV = -5.0) con AQ (112mM, pH = 7,4). La solución neurotóxica fue infundida en el estriado derecho usando para ello una jeringuilla Hamilton de 10 μ L en un volumen de 2 μ L infundidos a una velocidad de 1 μ L/ min.

El NGF fue purificado por aislamiento directo de la subunidad β a partir de glándulas submaxilares de ratón Balb/c macho adulto. Este proceder parte de una modificación por Ebendal (1984) del método de Mobley (1976). Para su infusión se utilizó una

jeringuilla Hamilton de 10 μL a un volumen de 10 μL a razón de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Utilizando las mismas coordenadas, a una concentración de 586 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Evaluación de la memoria y el aprendizaje

Transcurridos 15 días de la lesión, los animales se llevaron nuevamente al laberinto acuático de Morris, donde se realizaron tres pruebas diferentes.

Prueba de retención, con el objetivo de comparar el nivel de amnesia retrógrada. Las ratas se entrenaron a ocho ensayos para evaluar su habilidad de recordar la posición de la plataforma en el lugar anteriormente ubicado (SO).

Prueba de transferencia: Con el propósito de chequear la existencia de amnesia anterógrada las ratas fueron entrenadas a tres días de ensayos consecutivos para encontrar la plataforma en una nueva posición (NE) opuesta a la utilizada en la prueba de adquisición.

Prueba sensorimotora: Esta prueba se realizó con vistas a chequear las capacidades motoras de las ratas después de lesionadas. El nivel de agua se redujo de tal forma que la plataforma fue visible para el animal, midiendo de forma indirecta la velocidad de nado del animal, a través del tiempo que demora el animal en llegar a la plataforma.

Prueba de Rotación inducida por anfetamina Para su ejecución se utilizó un rotómetro automático, Rotorcid, que permitió contabilizar la cantidad de vueltas (360° completas) y el sentido de las mismas cuando el animal se trató con anfetamina, agonista dopaminérgico (5 mg / Kg, i.p.).

Estudios morfológicos

Se realizaron estudios morfológicos de tinciones e inmunohistoquímica para GFAP en un 20% de la población, que sirvieron para corroborar la eficiencia de la lesión estriatal con AQ y susceptibilidad a la reactividad astrocítica. Para esto, terminadas las pruebas conductuales, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral y perfundidos con una solución de formaldehído al 4%. Una vez que los cerebros fueron extraídos del cráneo, se mantuvieron de 1 a 2 horas en la misma solución fijadora y más tarde se sumergieron en soluciones de sacarosa a diferentes porcentajes (30, 15,7), y se mantuvieron durante toda la noche, siendo congelados posteriormente. Secciones coronales de 5 μm fueron preparadas de acuerdo al atlas estereotáxico (Paxino y Watson, 1989). Algunas de las secciones se procesaron para histología

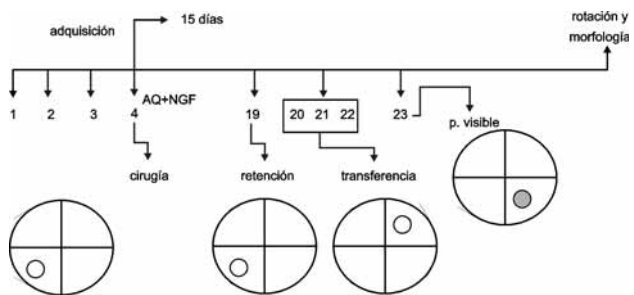


Figura 1. Diseño experimental

convencional, tinción violeta de Cresyl, y en el resto se desarrolló inmunohistoquímica para analizar la reactividad astrocítica.

Diseño Experimental

Los animales después de los 3 días de adquisición, fueron sometidos a la lesión unilateral en el estriado con AQ, así como NGF según el grupo experimental a que pertenecían. Los animales se dejaron reposar 15 días. Posteriormente, se le realizaron las pruebas que permitieron evaluar pérdida de la memoria (retención), capacidad de aprendizaje (transferencia), evaluación de las capacidades sensoriales y motoras en general (p. visible) y evaluación de la asimetría motora (rotación). Ver figura 3.

III. RESULTADOS

Laberinto Acuático de Morris. Memoria y Aprendizaje Espacial

Como el análisis de la varianza (ANOVA) no detectó diferencias entre los grupos experimentales en la prueba de adquisición ($p = 0.78$), fue posible hacer comparaciones de los resultados tanto entre grupos experimentales, como en el mismo grupo antes y después de la lesión y/o tratamiento trófico.

Test de Retención de la memoria El análisis de varianza (ANOVA) demostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F_{(4,57)} = 3.55$, $p = 0.011$). La comparación *post hoc* reveló que los grupos AQ y AQ&NGF ($p < 0.01$; $p < 0.05$, respectivamente) difirieron significativamente del grupo control, mientras

que los grupos AQNGF y NGFAQ, ocuparon una posición intermedia sin diferenciarse significativamente del grupo control. Aunque el grupo AQNGF no tuvo diferencias con el grupo lesionado (AQ), sí se observó una mejoría significativa del grupo NGFAQ con los animales lesionados (Fig. 2).

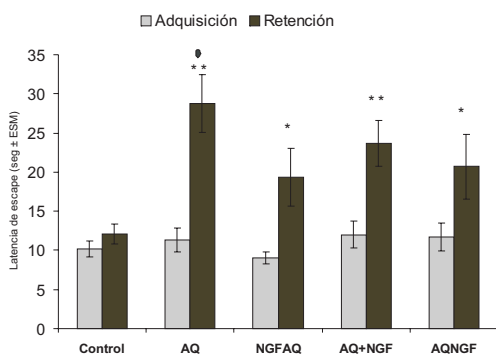


Figura 2. Comparación de las latencias de escape durante las pruebas de adquisición y de retención de los diferentes grupos experimentales. Las latencias de todos grupos experimentales fue significativamente superior a las del grupo control. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Además hubo diferencias entre el grupo NGFAQ y el grupo AQ. ° $p < 0.05$.

Sin embargo, cuando se realizó la comparación entre las latencias desarrolladas por los animales antes y después de la lesión y/o tratamiento, los

resultados demostraron que en todos los grupos, con la excepción del grupo control, se observó un deterioro en la estrategia de búsqueda de la plataforma de escape, mostrando latencias mucho mayores que las utilizadas durante la adquisición (AQ, $p < 0.01$; NGFAQ, $p < 0.05$; AQ&NGF, $p < 0.01$; AQNGF, $p < 0.05$), que denotaron un deterioro significativo en la retención de la memoria después de la lesión estriatal. Es importante destacar que, inclusive los animales controles, aun cuando no se diferenciaron significativamente de su ejecución previa en la adquisición, tuvieron una tendencia al aumento de la latencia, hecho que demuestra la complejidad de la prueba para los animales.

Prueba de Transferencia del aprendizaje Al analizar la comparación entre grupos experimentales utilizando el análisis de varianza (ANOVA) general con medidas repetidas (latencia), se observaron diferencias significativas entre los grupos ($F_{(4,57)} = 4.75$, $p < 0.01$) y entre los días de prueba ($F_{(2,114)} = 27.55$, $p < 0.01$), aunque no se observó interacción grupo x días. El análisis *post hoc* demostró que todos los grupos experimentales difirieron significativamente del grupo control, pero hay que tener en cuenta el exitoso desempeño de los animales controles en esta prueba, que hicieron que sus latencias de transferencia en los últimos días de prueba fueran significativamente mejores (más bajas) que las desarrolladas durante la prueba de adquisición (Fig. 3).

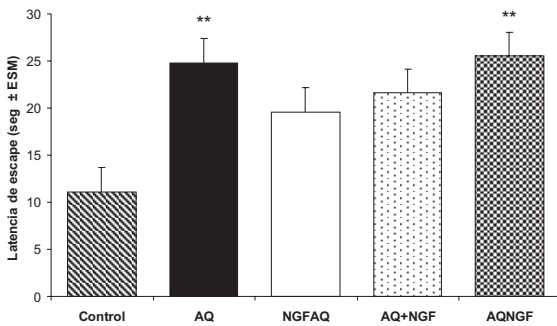


Figura 3. Comparación de las latencias de escape entre los grupos experimentales en la prueba de transferencia. Los grupos AQ y AQNGF necesitaron un mayor tiempo para encontrar la plataforma, diferenciándose significativamente del grupo control. ** $p < 0.01$

Tomando en consideración estos datos, realizamos también la comparación de todos los grupos experimentales en cuanto a su ejecución en los días de prueba de adquisición y de transferencia, y los resultados demostraron que los grupos NGFAQ y AQ&NGF, aún cuando no mejoraron su récord de latencia durante la adquisición, mantuvieron, sin empeorar significativamente, la puntuación alcanzada previamente, mientras que los restantes grupos AQ y AQNGF, lejos de mejorarlo

o mantenerse, demostraron un deterioro de su capacidad de aprendizaje, al aumentar sus latencia de escape por encima de los valores obtenidos en la adquisición (Fig 4).

Plataforma visible

Cuando el animal ya entrenado previamente tuvo la oportunidad de ver la plataforma de escape, aunque estuviera en una posición nunca antes explorada, las diferencias significativas entre los grupos desaparecieron. Esta prueba se realizó para evaluar de forma indirecta las habilidades natatorias y las capacidades sensoriales del animal después de

la lesión estriatal y si, en caso de deterioro de la misma, el tratamiento trófico podía ser efectivo. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en esta prueba, sí se pudo observar que los resultados coinciden con los obtenidos en la prueba de transferencia donde las latencias más bajas fueron desarrolladas por los animales controles, seguido de una ejecución intermedia de los grupos NGFAQ y AQ&NGF y con una latencia mucho más alta desarrollada por los grupos AQ y AQNGF (Fig.5).

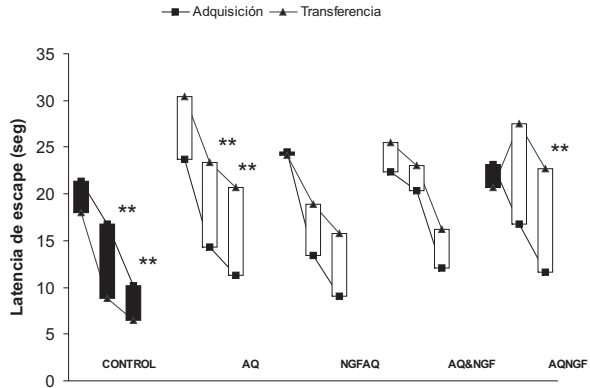


Figura 4. Comparación de las pruebas de adquisición y de transferencia en los diferentes grupos experimentales. Las barras oscuras demuestran la mejoría en la ejecución durante la prueba de adquisición, mientras que las barras claras denotan el empeoramiento de los resultados. **p<0.01

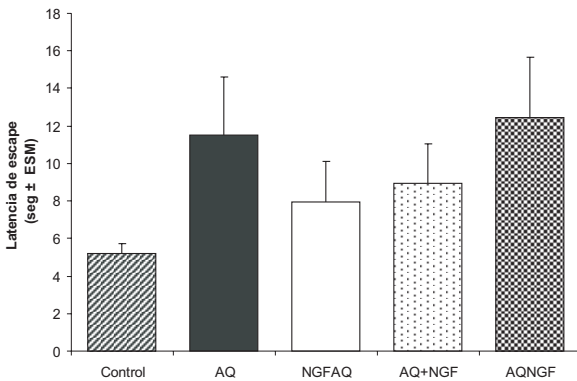


Figura 5. Comparación entre todos los grupos experimentales en la prueba de plataforma visible. No se observó ninguna diferencia significativa.

Rotaciones inducidas por anfetamina

Todos los grupos experimentales, incluyendo al grupo control fueron sometidos a la prueba de rotación inducida por anfetamina. En los animales controles observamos la conducta de los mismos cuando no existía asimetría motora que provocara giros en una dirección. Estos animales mostraron una conducta estereotipada típica de la reacción de un cerebro intacto ante la acción de un agonista dopaminérgico, que los mantuvo en un vaivén equilibrado, sin rotar a ninguno de los lados. Esta conducta estereotipada fue disminuyendo en intensidad a medida que pasó el tiempo de acción del agonista, hasta desaparecer a los 90 min.

En los animales lesionados, la asimetría funcional de los ganglios basales, provocada por la lesión unilateral del estriado derecho provocó que esta hiperactividad se expresara en forma de un desplazamiento en círculos, con giros predominantemente hacia el lado de la lesión. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales en cuanto a la cantidad de vueltas totales. Este análisis reveló que mientras los grupos no mostraron diferencias significativas en la cantidad de vueltas a la izquierda sí se observó una diferencia marcada entre los grupos sometidos al AQ con respecto a las vueltas al lado derecho ($F_{(4,46)} = 4.61$ $p = 0.0032$).

Los análisis *post hoc* (Duncan) demostraron que los animales pertenecientes a los grupos AQ y NGF&AQ fueron los de mayor asimetría motora en su desplazamiento inducido por amfetamina y expresado en el mayor número de vueltas a la derecha.

La prueba de comparación de medias *t* de student demostró que la diferencias significativas entre las vueltas a la derecha y a la izquierda también se evidenciaron en los grupos AQ y NGF&AQ, hecho que reafirmó una marcada asimetría en estos animales ($p = 0.001$ y $p = 0.006$ respectivamente). Aunque en los grupos restantes no se observaron diferencias significativas, hubo una tendencia a la asimetría sobre todo en el grupo AQNGF ($p = 0.069$). El grupo NGFAQ no presentó una diferencia tan marcada ($p = 0.112$). (Fig. 6).

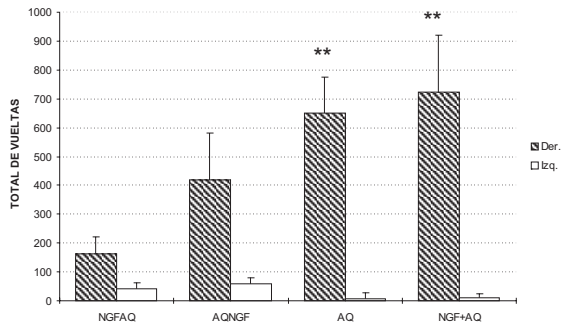


Figura 6. Actividad rotatoria inducida por amfetamina. Los grupos AQ y NGF+AQ denotaron una asimetría marcada, ipsilateral al hemisferio lesionado. ** $p < 0.01$.

Estudios morfológicos

Los resultados morfológicos denotaron una pérdida neuronal marcada en el estriado lesionado, con la presencia de núcleos picnóticos que demuestran la muerte celular, cuadro que se diferencia notoriamente de lo observado en el estriado contralateral intacto. Se observó que la lesión con AQ produjo el encogimiento del estriado y el ensanchamiento del ventrículo lateral derecho ipsilateral al estriado lesionado. Todos los animales lesionados mostraron una hipertrofia de reactividad astrocítica observado en la inmunohistoquímica de GFAP. Esta gliosis se observó a lo largo de todo el estriado pero se observó también en la *substantia nigra* y en el *globus pallidus*. Este resultado confirma la existencia de una lesión unilateral provocada por el ácido quinolínico en estos animales y permite suponer que los cambios provocados por la administración de NGF se deben a efectos de esta proteína que modifica la intensidad de esa lesión, aunque no se hicieron estudios morfológicos de los animales tratados.

IV. DISCUSIÓN

Nuestros resultados confirmaron que la administración intraestriatal de ácido quinolínico provoca la muerte de neuronas en esa estructura e induce defectos cognitivos y motores comparables a los que se reportan en pacientes de EH, como fue demostrado en anteriores estudios (Francis-Turner, 2000). Además, se demostró que la administración previa de NGF a los animales redujo los defectos cognitivos y la asimetría motora inducidas por la lesión.

Como era de esperar, los animales se comportaron de forma homogénea en la etapa de adquisición. Además, aquellos que excedieron los 25s de latencia media fueron retirados, aumentando así el grado de uniformidad inicial de los grupos. Lo anterior permite considerar que cualquier cambio observado después de la lesión o el tratamiento con NGF no es causado por diferencias iniciales entre los animales, teniendo en cuenta que la distribución por grupos se hizo de forma completamente aleatoria.

Por otra parte, la prueba de plataforma visible revela que las capacidades de nado y sensoriales, fundamentalmente visuales, no fueron seriamente comprometidas por la lesión. Además, aunque se observaron diferencias cualitativas entre los animales controles y los lesionados en su forma de nado y en una marcada asimetría, estos fueron capaces de utilizar mecanismos compensatorios que les permitieron obtener un resultado final comparable a los controles. Esto se demuestra en el hecho de que los resultados de todos los grupos fueron similares en esta prueba. Por tanto, las diferencias observadas en las pruebas de retención y transferencia indican un compromiso específico de mecanismos de memoria y no, afectación de otras capacidades involucradas en la solución de la prueba.

Al comparar el último día de la adquisición con el día de retención se observó un elevado grado de amnesia retrógrada de todos los animales lesionados, tratados o no con NGF. También, Furtado y Mazurek (1996), utilizando el mismo paradigma experimental en modelos de EH, observaron déficit en la retención con la plataforma oculta.

Se observó una mejoría en la retención de los animales tratados con NGF, dos días antes de aplicación de AQ con respecto al grupo lesionado, mientras que los grupos con tratamiento simultáneo o posterior a la lesión con AQ no evidenciaron mejoría alguna. Asimismo, en la prueba de transferencia, que sirve para comprobar la presencia de amnesia anterógrada, los animales tratados previamente (NGF&AQ) o simultáneamente (NGF&AQ) tuvieron latencias inferiores a los lesionados (AQ) o tratados con posterioridad (AQNGF) pero superiores a los controles. Estos resultados pueden dar una idea de la importancia del núcleo estriado en los procesos de aprendizaje y sugieren que el NGF pudiera tener un efecto neuroprotector, pero no neurorestaurador, sobre las estructuras estriatales agredidas por la neurotoxina, como lo indica la relación demostrada entre el momento de la aplicación y los resultados conductuales.

Considerando que las interneuronas colinérgicas estriatales son la única población neuronal de esa estructura que expresa receptores al NGF (Koh y Loy, 1989) este efecto preservador de las funciones de memoria pudiera atribuirse a una mejor supervivencia de estas neuronas en el grupo NGF&AQ y, en menor medida, al grupo NGF&AQ. Vasiljevic y

cols (2004), demostró que la inyección unilateral de NGF en el estriado incrementó la actividad de AChE de cerebro anterior ipsi y contralateral. Él justificó esta situación, teniendo en cuenta los receptores trkA y p75 son transportados anterogradamente hacia la región blanco del cerebro basal anterior y son capaces de establecer relaciones con los receptores de alta afinidad de esta área del cerebro. Por otra parte Menei y cols. (2000) han mostrado que el efecto neuroprotector también pudiera alcanzar, en menor medida a otras poblaciones estriatales, lo que pudiera ser importante en relación con las alteraciones motoras. A diferencia de otras patologías caracterizadas por la pérdida de la memoria, los pacientes con EH tienen problemas con el recobrado de la memoria (Santberg y Coyle, 1984), aspecto que hemos logrado reproducir en nuestro experimento.

El incremento significativo de las rotaciones, ipsilaterales al estriado lesionado, inducidas por anfetamina se observó en los animales lesionados. La explicación a esta conducta hiperquinética clásica es la pérdida de las proyecciones gabaérgicas inhibitorias (Hamraye et al., 1990). En este modelo, las ratas rotaron en respuesta a un agonista dopaminérgico como la anfetamina que actúa indirectamente por descarga de dopamina en las terminales dopaminérgicas (Schwarz et al, 1992). Probablemente, la pérdida de proyección GABAérgica estriatal inhibitoria causada por lesión unilateral con AQ, produzca una excitación asimétrica en células que normalmente están bajo los efectos inhibidores de la dopamina estriatal. El tratamiento con NGF antes y después, pero no simultáneo, redujo las rotaciones inducidas por anfetamina en ambos grupos en relación con el grupo AQ. Este comportamiento singular parece sugerir que las causas de la asimetría motora y del déficit conductual son diferentes y es difícil de explicar a la luz de los conocimientos actuales. Es posible que el efecto antes citado sobre las neuronas GABAérgicas de proyección estriatal sea responsable de esos efectos (Menei, 2000), aunque estudios posteriores deben confirmar esa hipótesis.

Adicionalmente, nuestro estudio demostró que la lesión estriatal con AQ induce una marcada muerte neuronal en todo el estriado, acompañada por una gliosis evidenciada por la alta reactividad en la expresión de GFAP. En los animales lesionados con AQ, esta marcada gliosis aparece no solo en el estriado sino en otras áreas como globus pallidus y substantia nigra. Sin embargo, estas áreas están lejos del sitio de inyección, por lo que resulta poco probable que la difusión del AQ inyectado al estriado sea la causante de esta gliosis. Nos inclinamos a pensar que esta reacción tisular sea debida a la degeneración retrógrada o anterógrada que habitualmente se produce después de una lesión (Volpe et al., 1996), una consecuencia del aumento de la actividad neuronal en esas estructuras producto de la reducción del efecto inhibitorio que normalmente ejerce el estriado.

Nuestros resultados indican un papel protector del NGF, que reduce el daño provocado por el AQ. Resultados obtenidos por Menei y cols. (2000) mostraron un 40% de supervivencia neuronal en ratas sometidas a AQ con implantación de células productoras de NGF una semana antes de la lesión y confirman esta hipótesis. Esta acción neuroprotectora fue más intensa en los animales tratados antes de la lesión, moderada cuando el tratamiento se hizo al mismo tiempo y estuvo ausente cuando el tratamiento fue posterior. La ausencia de estos efectos en el grupo AQNGF indica que esta neurotrofina no es capaz de promover procesos de plasticidad luego de que la lesión se encuentra establecida.

Pudiera pensarse que el modesto efecto del NGF aplicado simultáneamente se deba a la mayor rapidez y extensión de los efectos del AQ, y que la implantación del NGF junto al AQ, lejos de contrarrestar los efectos de éste último, pueda disparar mecanismos bioquímicos capaces de provocar la muerte celular por apoptosis a través del factor nuclear kB (FN-kB), el cual es igualmente activado por AQ y factores neurotróficos en general. Los efectos de su acción pueden ser fatales para las neuronas estriatales de ratas si se estimulan por un largo período de tiempo (Qin et al., 1998), teniendo en cuenta que el NGF actúa sobre una población más restringida de neuronas colinérgicas estriatales, que representa solo el 10% del total de neuronas en el estriado, y su mecanismo de acción es lento (Fallon y Loughlin, 1993).

Los resultados del presente trabajo confirman la validez y utilidad del modelo de lesión con AQ para estudiar posibles estrategias terapéuticas destinadas al tratamiento de la corea de Huntington.


Finalmente, la evaluación del NGF con este propósito sugiere que la terapia neurotrófica puede ser eficaz para prevenir el daño neurológico causado por la enfermedad pero no, para corregir los déficits una vez que la lesión se establece. Adicionalmente, también se deben tener en cuenta y estudiar las vías de administración de los factores neurotróficos, de las que dependerá en gran medida el éxito de la terapia (Castellanos-Ortega et al., 1999). Esta acción del NGF, restringida a la neuroprotección puede, sin embargo, ser de gran importancia si se considera que es posible actualmente predecir, con estudios genéticos y moleculares, desde edades tempranas, qué individuos van a padecer la enfermedad, por lo que las estrategias preventivas adquieren un valor relevante (Kordower, 1999).

BIBLIOGRAFÍA

- Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KW (1991). Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J. Neurosci.* 11, p: 1649-1659.
- Bergado JA, Fernández CI, Gómez-Soria A, and González O. (1997) Chronic intraventricular infusion with NGF improves LTP in old cognitively-impaired rats. *Brain Res.* 770: 1-9.
- Block F, Kunkel M, Schwarz M (1993). Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. *Neurosci. Lett.* 149, p: 126-128.
- Castellanos-Ortega MR, Cruz-Aguado R, Martínez-Martí L. (1999). El factor de crecimiento nervioso: Posibilidades y limitaciones de su aplicación clínica. *Rev Neurol.* 29(5): 439-47
- Chen KS, Maliah E, Mallory M, Gage FH (1995). Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neurosci.* 68: 19-27.
- Di Figlia M. (1990). Excitotoxic injury of neostriatum: A model form Huntington's disease. *Trends Neurol. Sci.* 13, p: 286-189.
- Dunnett SB. Neural transplantation in animal models of dementia. *Eur. J. Neurosci.* 1990; 2: 567-587.

- Ebendal T, Olson L., Seiger A., Belew (). NGF in chick and rat tissues. In Black, ed. Cellular and Molecular Biology of Neuronal Development. New York: Plenum Press. 1984.
- Fallon JH, Loughlin SE (1993). Functional implications of the anatomical localization of neurotrophic factors. In: Neurotrophic Factors, S. E. Loughlin, J. H. Fallon (eds.), Academic Press, Inc. San Diego, California; p: 1-24.
- Francis-Turner L, Valouskova V. (1996) Nerve growth factor and nootropic drug Cerebrolysin but not fibroblast growth factor can reduce spatial memory impairment elicited by fimbria-fornix transection: short-term study. *Neurosci. Lett.* 202: 193-196.
- Francis-Turner L., Cruz-Aguado R., Antunez I., Rosillo J.C.(2000) Caracterización conductual de un modelo de enfermedad de Huntington en ratas inducido por ácido quinolínico. *Revista de Neurología.* 30(11): 1016-1021.
- Furtado JC and Mazurek MF. (1996) Behavioral characterization of quinolinate-induced lesions of the medial striatum: relevance for Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 138 (1): 158-68.
- Gage FH, Batchelor P, Chen KS, Chin D, Higgins GA, Koh S, Deputy S, Rosenberg MB, Fisher W, and Björklund A. (1989). NGF receptor reexpression and NGF-mediated cholinergic neuronal hypertrophy in the damaged adult neostriatum, *Neuron* 2: 1177-1184.
- Giacobini MB, Hoffer BJ and Olson L.(1990) Trophic influences of fibroblast growth factor on fetal brain tissue grafts. *Soc. Neurosci. Abstr.* 16: 485.
- Hamraye P, Richie D, Maziere M, Isacson OA.(1990) A primate model of Huntington's disease: Behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesion of the caudate-putamen in the baboon. *Exp. Neurol.* 108, p: 91-104.
- Koh S, Loy R. (1989). Localization and development of nerve growth factor-sensitive rat basal forebrain neurons and their afferent projections to hippocampus and neocortex. *J. Neurosci.* 9: 2999-3018.
- Kordower JH, Isacson O, Emerich DF (1999). Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? *Exp. Neurol.* 159: 4-20.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 1951;p: 116: 321-363.
- Markowaka AL, Koliatsos VE, Breckler SJ, Price DL, Olton DS. (1994) Human nerve growth factor improves spatial memory in aged but not young rats. *J. Neurosci.* 14: 4815-4824.
- Menei P, Nerriere-Daguin V, Jollivet C, Brachet P, Benoit JP. (2000) Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage. *Exp. Neurol.* 161:259-272.
- Mobley WC (1976). Characterization and isolation of proteolytically modified NGF. *Biochemistry.* 15: 5544-5552.
- Mobley WC, Rutkowski JL, Tennekoon SJ, Buchanan K, Johnston MV. (1985) Choline acetyltransferase in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor. *Science* 229: 284-287.

- Nitta, A., Murase, K., Furukawa, Y., Hayashi, K., Hasegawa, T., Nabeshima, T (1993). Effect of oral administration of a stimulator for nerve growth factor synthesis in basal forebrain lesioned rats. *Eur. J. Pharmacol.* 250: 23-30.
- Qin ZH, Wang Y, Nakai M, Chase TN. (1998). Nuclear factor-kB contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Mol Pharmacol.* 1998; 53:33-42.
- Sanberg PR, Coyle JT (1984). Scientific approaches to Huntington's disease, *CRC Crit Rev. Clin. Neurobiol.* 44.
- Scott SA, Mufson EJ, Weingartner JA, Skau KA, Crutcher KA. (1995) Nerve growth factor in Alzheimer's disease: Increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis. *J. Neurosci.* 15: 6213-21.
- Schwarz M, Block F, Topper R, Sontag KH, Nath J (1992). Abnormalities of somatosensory evoked potentials in the quinolinic acid model of Huntington's disease: Evidence that basal ganglia modulate sensory cortical input. *Ann. Neurol.* 32, p: 358-364.
- Sporn MB, and Roberts AB (1988) Peptide growth factor are multifunctional. *Nature*; 332, p: 217-219.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome. *Cell.* 72, p: 971-983.
- Vasiljevic I; Jovanovic M, Colic M, Micic D, Ninkovic M, Malicevic Z. (2004). Nerve growth factor protects cholinergic neurons against quinolinic acid-induced excitotoxicity in wistar rats. *Acta Veterinaria*, 54 (2-3) 105-113.
- Volp y Wildmann (1998) Brain-derived neurotrophic factor prevents the loss of neurons induces by excitotoxic striatal.pallidal lesions. *Neuroscience* 83 (3): 741-748.
- Wilkler J, Thal LJ. (1995). Effects of nerve growth factor treatment on rats lesions of the nucleus basalis magnocellularis produced by ibotenic acid, quiaqualic acid and AMPA. *Exp. Neurol.* 136: 234-250.

Agradecimientos: A Juan Carlos Rosillo, por su ayuda técnica en los procesamientos histológicos de nuestras muestras. 

| Referencia | Fecha de recepción | Fecha de aprobación |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Turner, L. F., Bergado Acosta, J. R., Bergado Rosado, J. (2006). Efectos del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) sobre la conducta en un modelo experimental de Corea de Huntington en ratas. <i>Revista Tumbaga</i> , 1, 55-68 | Día/mes/año 22/05/2006 | Día/mes/año 09/08/2006 |