

Cholesterol contributes to dopamine-neuronal loss in MPTP mouse model of Parkinson's disease: Involvement of mitochondrial dysfunctions and oxidative stress

Presentado por: R. Blanco Martínez-Illescas¹, B. Navarro González¹
¹Carrera de Biomedicina, Universidad Francisco de Vitoria, Madrid

Rajib Paul¹, Amarendranath Choudhury¹, Sanjeev Kumar², Anirudha Giri³, Rajat Sandhir⁴, Anupom Borah¹

¹Cellular and Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Life Science and Bioinformatics, Assam University, Silchar, Assam, India, ²Microbial and Molecular Immunology Laboratory, Department of Life Science and Bioinformatics, Assam University, Silchar, Assam, India, ³Environmental Toxicology Laboratory, Department of Life Science and Bioinformatics, Assam University, Silchar, India, ⁴Department of Biochemistry, Panjab University, Chandigarh, India

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El Parkinson surge de la neurodegeneración de las células dopaminérgicas lo que constituye un descenso en los niveles de dopamina y la aparición de cuerpos de Lewy (agregados de α -synucleína). Por tanto, la aparición de síntomas como la bradicinesia, el temblor en reposo, la rigidez o la inestabilidad postural es consecuencia de la muerte de estas neuronas debido a disfunciones mitocondriales, moléculas endógenas y el colesterol y oxiterol. De esta forma, se establece una relación entre los altos niveles de colesterol en plasma y la aparición del Parkinson (hipótesis de que una dieta alta en colesterol favorece el desarrollo del Parkinson en modelos animales). Así la exposición de las neuronas a altos niveles de colesterol podría tener una equivalencia con el desarrollo de la propia enfermedad, por tanto: ¿La hipercolesterolemia deteriora las neuronas dopaminérgicas en cuanto a la funcionalidad de los complejos mitocondriales y el estrés oxidativo en modelos animales de Parkinson?

Diseño Experimental

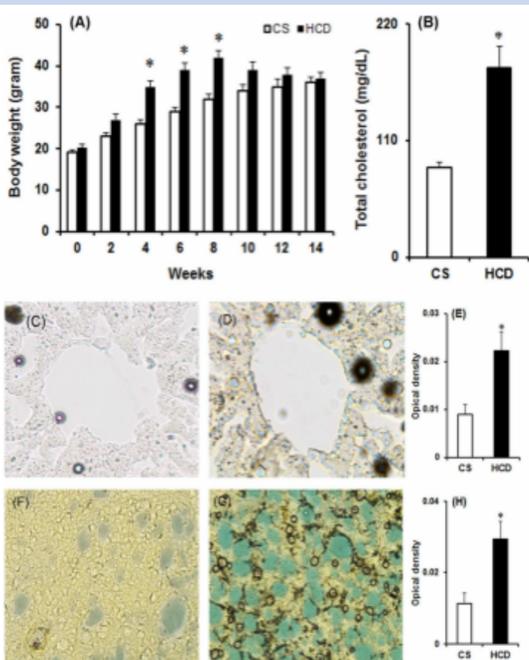
Empleo de ratones albino. Se dividen en dos grupos, un control y otro con dieta alta en colesterol (HCD). Tras 13 semanas se les inyecta MPTP durante dos días consecutivos induciendo el Parkinson (PD). De tal forma que tendremos 4 grupos: control, HDC, MPTP, HDC+MPTP. 7 días después de inyectar MPTP se les realizan test de comportamiento motor. Después se sacrifican para el estudio neuroquímico y de hipercolesterolemia.

Métodos para analizar la dopamina y las neuronas dopaminérgicas

- **Niveles de dopamina estriatal:** HPLC-ECD.
- **Inmunohistología tirosina hidroxilasa:** incubaciones con un anticuerpo primario (ON) y con un anticuerpo secundario. Después se incuba en sistema DAB de sustrato líquido.

Efectos de la dieta alta en colesterol

En comparación con el control el grupo HCD presenta altos niveles de colesterol en hígado y cerebro revelados por la histoquímica y la densidad óptica. Además se da un aumento del peso de hasta un 20%.



Hipercolesterolemia en el estrés oxidativo en MPTP

Radical Hidroxilo

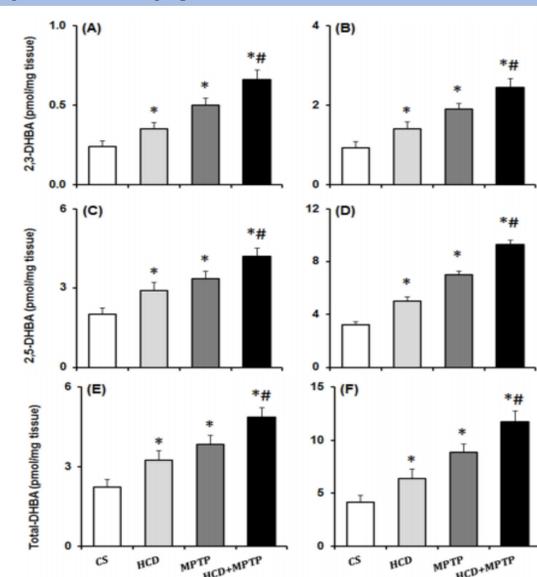
El colesterol aumenta los niveles de radical hidroxilo medidos con DHBA. Así, el grupo HCD+MPTP presenta los niveles más altos.

Niveles de glutatión

En presencia de colesterol la actividad SOD+Catalasa aumenta alcanzando los valores más altos en el grupo HCD+MPTP. En el grupo MPTP, comparándolo con HCD, se da un aumento menor de SOD pero mayor de catalasa.

Actividad antioxidante enzimática

En HCD, la actividad nigroestriatal de SOD y catalasa aumenta significativamente. El aumento también es significativo en el grupo HCD+MPTP.



Niveles de radicales hidroxilo

Niveles de glutatión

Actividad antioxidante enzimática

MATERIALES Y MÉTODOS

Métodos para comprobar los niveles de colesterol

- **Análisis del colesterol en plasma:** Kit de Colorimetría y midiendo la absorbancia 500 nm.
- **Histoquímica del colesterol en hígado y cerebro:** método de Schultz. Incubación con sulfato de aluminio ferroso y acético con sulfúrico (el colesterol se ve verde-azul) y medición de la densidad óptica.

Análisis de los parámetros de conducta

- **Acinesia:** anotación del tiempo en el que el animal mueve sus 4 extremidades.
- **Catalepsia:** se colocan las patas traseras sobre un bloque elevado 3 cm y se mide el tiempo que tarda en bajar las patas.
- **Swim test:** se coloca al animal en agua durante 10 minutos y se puntúa su habilidad para nadar cada minuto del 0-3.

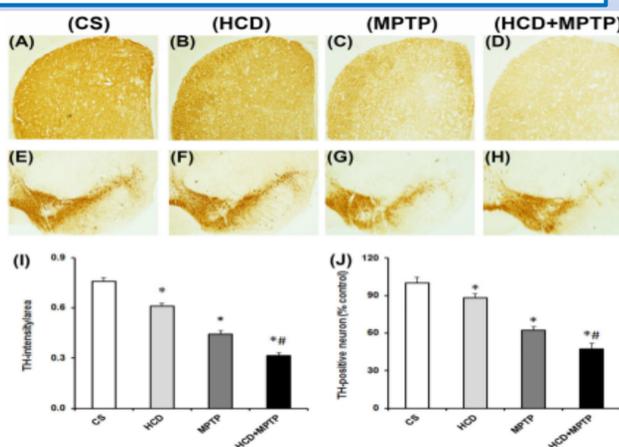
RESULTADOS

Efecto de la hipercolesterolemia en la dopamina estriatal de MPTP

Respecto al control se experimenta un descenso de la dopamina estriatal (28% en HCD y 42% MPTP). En el grupo HCD+MPTP esta disminución es del 58% respecto al control y de un 30% respecto a MPTP.

Hipercolesterolemia y la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas en MPTP

Se produce un descenso relevante en el número de neuronas dopaminérgicas, TH-Iminorreactividad y TH+ comparando los grupos MPTP y HCD con el control respectivamente. El grupo HCD+MPTP es el que presenta un descenso más marcado.

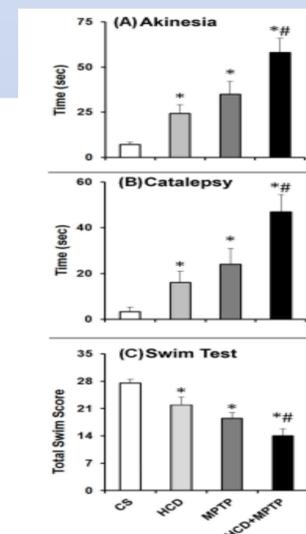


Análisis del funcionamiento mitocondrial y el estrés oxidativo

- **Actividad del complejo mitocondrial I:** se activa con NADH y se mide la absorbancia.
- **Actividad de los complejos mitocondriales II y III**
- **Estimación de radicales hidroxilo:** HPLC para medir los niveles de DHBA.
- **Niveles reducidos de glutatión:** medir los niveles de GSH en HPLC.
- **Actividad de la SOD:** activando con peróxido de hidrógeno.
- **Conteo neuronal de tirosinohidroxilasa positivo.**

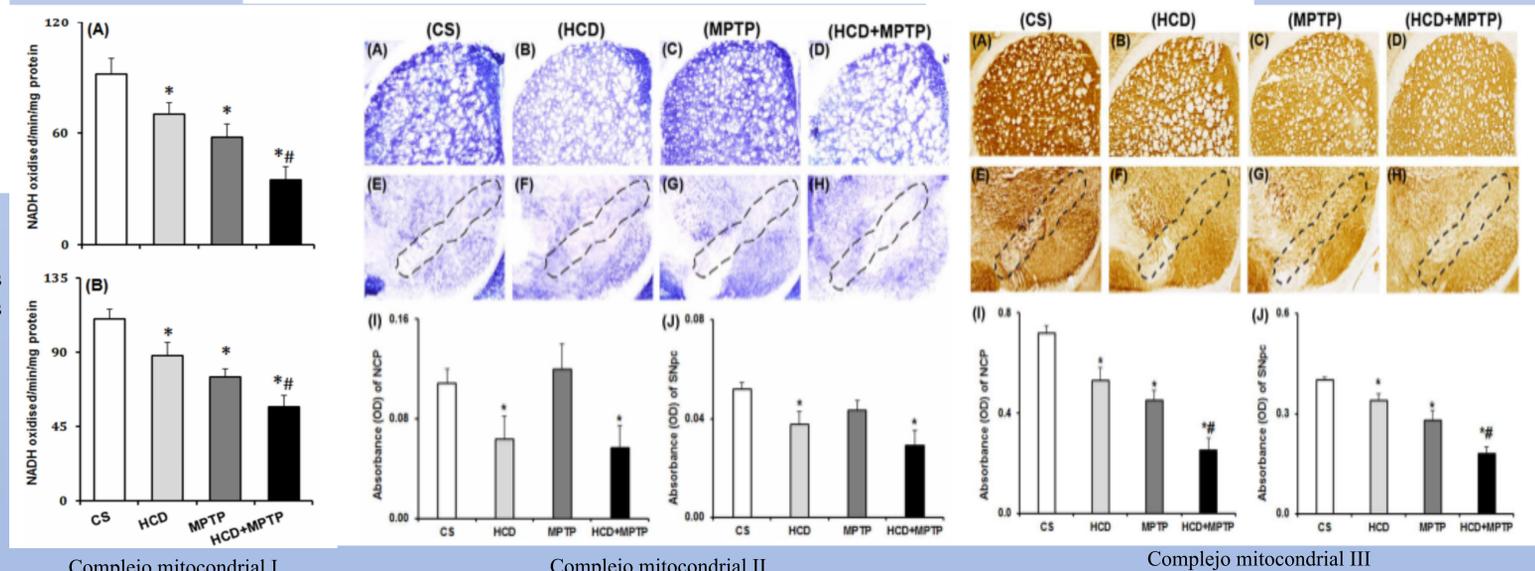
Hipercolesterolemia en el comportamiento motor del Parkinson

Comparando los test de comportamiento tras aplicar MPTP se observa un aumento del score en acinesia y catalepsia y un descenso en la puntuación del nado en comparación con el control. En el grupo HCD+MPTP se experimenta un aumento en acinesia y catalepsia y un descenso en swim test comparado con MPTP.



Hipercolesterolemia en los complejos mitocondriales nigroestriales en MPTP

En el grupo HCD aparece una inhibición del CI que se hace aún más evidente en el grupo HCD+MPTP. El colesterol hace decrecer la actividad CI. La actividad de CII no se ve afectada por MPTP pero sí por el colesterol. La histoquímica de CIII muestra que en MPTP+HCD se potencia la reducción de la actividad.



Complejo mitocondrial I

Complejo mitocondrial II

Complejo mitocondrial III

CONCLUSIONES

Los estudios presentados sugieren una relación entre la hipercolesterolemia y la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas de la región nigra, que se ve agravada en los modelos MPTP debido al estrés oxidativo. Esto se basa en cuatro puntos:

- Empeoramiento del comportamiento motor.
- Exageración de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la región estriatal.
- Reducción de la actividad de los complejos mitocondriales estriales.
- Intensificación del estrés oxidativo nigroestriatal.

Este estudio es la primera evidencia directa in vivo de la neurodegeneración dopaminérgica del mesencéfalo inducida por la hipercolesterolemia y la exacerbación de los síntomas del PD en modelos MPTP. Los resultados demuestran la implicación de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (o viceversa) en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la hipercolesterolemia.