

**Utilización de la  $^{11}\text{C}$ -(+)- $\alpha$ -Dihidrotetrabenazina para la evaluación de la innervación dopaminérgica en modelos animales de la enfermedad de Parkinson.**

María Collantes<sup>1</sup>, Iván Peñuelas<sup>1,2</sup>, Lydia Álvarez-Erviti<sup>3</sup>, Javier Blesa<sup>3</sup>, Josep María Martí-Climent<sup>2</sup>, Gemma Quincoes<sup>2</sup>, Mercedes Delgado<sup>5</sup>, Margarita Ecay<sup>1</sup>, Alicia Martínez<sup>1</sup>, Javier Arbizu<sup>2</sup>, María Cruz Rodríguez-Oroz<sup>4</sup>, José Obeso<sup>4</sup>, José Ángel Richter<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Investigación microPET, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA)-Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona.

<sup>2</sup>Servicio de Medicina Nuclear, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona.

<sup>3</sup>Laboratorio de Trastornos del Movimiento, Área de Neurociencias, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra, Pamplona.

<sup>4</sup>Departamento de Neurología, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona.

<sup>5</sup>Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid.

Unidad de Investigación microPET.  
Clínica Universitaria de Navarra  
Avda. Pío XII 36  
31008. Pamplona, Navarra.  
Tlfn 948 255 400 ext 4988  
Fax 948 296 500  
mcollant@unav.es

## **Utilización de la $^{11}\text{C}$ -(+)- $\alpha$ -Dihidrotetrabenazina para la evaluación de la innervación dopaminérgica en modelos animales de la enfermedad de Parkinson.**

### **RESUMEN**

**Objetivo:** Este trabajo evalúa la idoneidad del radiotrazador  $^{11}\text{C}$ -(+)- $\alpha$ -dihidrotetrabenazina ( $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ) para cuantificar mediante PET la innervación dopaminérgica en rata y mono, especies utilizadas como modelos animales en el estudio de la enfermedad de Parkinson.

**Material y métodos:** En ratas se estudió una población control sana (n=10) y el efecto del neurotóxico 6-hidroxi dopamina (6-OHDA), además de realizarse estudios PET con  $^{18}\text{F}$ -DOPA y de autorradiografía digital cuantitativa. El estudio en *Macaca fascicularis* se realizó en animales control y tratados con el tóxico 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

**Resultados:** En ambas especies se obtuvieron imágenes de gran calidad donde se observó una alta captación de  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ en el estriado. La cuantificación se realizó mediante la creación de imágenes paramétricas y cálculo del potencial de unión (BP). La medida del BP en la población control de ratas arrojó un valor de  $1,10 \pm 0,16$  (media  $\pm$  EE), mientras que los estriados dañados con 6-OHDA mostraron una captación disminuida en función del grado de lesión. Las imágenes obtenidas con  $^{18}\text{F}$ -DOPA no fueron aptas para el análisis al no discriminar los estriados, mientras que el estudio mediante autorradiografía digital cuantitativa confirmó la elevada afinidad de la  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ por estas estructuras. En monos, el valor final de BP fue de 1,31 y 1,06 mientras que el tratamiento con MPTP disminuyó la captación en un 40%.

**Conclusiones:** La calidad de las imágenes PET y la disminución de captación en las lesiones con 6-OHDA y MPTP indican que la  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ es un radiotrazador adecuado para el estudio de la innervación dopaminérgica en estas especies animales.

**Palabras clave:**  $^{11}\text{C}$ -(+)- $\alpha$ -dihidrotetrabenazina, PET, sistema dopaminérgico, rata, mono.

## Use of $^{11}\text{C}$ -(+)- $\alpha$ -Dihydrotetrabenazine for the assessment of dopaminergic innervation in animal models of Parkinson's disease.

### ABSTRACT

**Aim:** This study evaluates the utility of  $^{11}\text{C}$ -(+)- $\alpha$ -dihydrotetrabenazine ( $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ) for quantification of dopaminergic innervation by PET in rat and monkey, two animal species used as animal models of Parkinson's disease.

**Material and methods:** In rats, healthy control animals (n=10) and the effect of 6-hydroxidopamine (6-OHDA) neurotoxic were studied.  $^{18}\text{F}$ -DOPA PET studies and digital quantitative autoradiography were also carried out. Studies with *Macaca fascicularis* were performed in control and 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treated animals.

**Results:** In both species  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ generates high quality images with clear uptake in the striatum.  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ uptake quantification was estimated by the creation of parametric images and binding potential (BP) calculation. BP in control rats was  $1,10 \pm 0,16$  (mean  $\pm$ SEM), whereas 6-OHDA produced a decrease in the uptake depending on the lesion degree. Images obtained with  $^{18}\text{F}$ -DOPA didn't allow further analysis, whereas digital quantitative autoradiography studies confirmed the high affinity of striatum by  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ. In monkeys BP values were 1.31 and 1.06 and MPTP treatment reduced uptake by 40%.

**Conclusions:** The quality of PET images and the decrease of uptake in 6-OHDA and MPTP lesions point out that  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ is an appropriate radiotracer for the study of dopaminergic innervation in these animal models.

**Keywords:**  $^{11}\text{C}$ -(+)- $\alpha$ -dihydrotetrabenazine, PET, dopaminergic system, rat, monkey.

## INTRODUCCIÓN

La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta y la disminución del contenido de dopamina estriatal representan las alteraciones más importantes de la enfermedad de Parkinson (EP). Actualmente, los mecanismos etiopatogénicos involucrados en esta pérdida neuronal son todavía desconocidos<sup>1</sup>, por lo que el desarrollo de modelos animales que imiten la EP es importante para estudiar la patogénesis y la progresión de esta enfermedad neurodegenerativa y poder probar la eficacia de nuevos agentes o procedimientos terapéuticos. Debido a que la EP no ocurre de manera espontánea en animales, se utilizan sustancias neurotóxicas para provocar la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas y reproducir el proceso patológico de la EP.

Uno de los modelos clásicos de EP en roedores es el de rata lesionada con la neurotoxina 6 hidroxidopamina (6-OHDA). La 6-OHDA no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que esta es administrada mediante inyección esterotáxica en el tejido cerebral. Dependiendo de la dosis y lugar de la inyección (haz prosencefálico medial, sustancia negra, estriado, haz nigroestriatal o inyección intraventricular) el patrón y la rapidez de pérdida neuronal es diferente, pero en todos los casos se produce una degeneración de las neuronas dopaminérgicas<sup>2</sup>. Otro de los modelos clásicos utilizados en primates no humanos es el del mono tratado con el tóxico 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), cuya administración parenteral produce pérdida de neuronas en la sustancia negra compacta y el consecuente déficit dopaminérgico estriatal<sup>3</sup>.

El estudio de estos modelos animales necesita contar con métodos fiables que evalúen los cambios producidos en la actividad dopaminérgica, bien para conocer el grado de lesión producido como para valorar la eficacia de nuevos tratamientos. Clásicamente, los métodos de valoración utilizados son los estudios comportamentales o bien técnicas histológicas o de autorradiografía que implican el sacrificio del animal<sup>4,5,6,7</sup>. En este sentido, las técnicas no invasivas suponen una gran ventaja ya que permiten el seguimiento longitudinal de un mismo animal a lo largo de todo el estudio. Por otra parte, en la EP se conoce que la aparición de síntomas clínicos no se desarrolla completamente hasta que no existe una pérdida de alrededor del 50-60% de las neuronas

dopaminérgicas en la sustancia negra compacta y un 70% de la dopamina estriatal<sup>8</sup>. Por lo tanto, la utilización de técnicas no invasivas permitiría detectar animales presintomáticos con lesión dopaminérgica en los que se podrían ensayar nuevos tratamientos (ej. neuroprotectores) en estos momentos iniciales de la enfermedad.

La tomografía de emisión de positrones (PET) ha sido ampliamente empleada en la investigación y evaluación de la EP. Actualmente, el desarrollo de nuevos equipos dedicados a pequeños animales abre la posibilidad de aplicar la tecnología PET en el estudio de modelos animales. La 6-[(<sup>18</sup>F)]-fluoro-L-DOPA (<sup>18</sup>F-DOPA)<sup>9</sup> es uno de los radiotrazadores PET más utilizados para el estudio del sistema dopaminérgico. La <sup>18</sup>F-DOPA sirve de sustrato de la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) que se encuentra en las neuronas presinápticas y estima la capacidad de síntesis y almacenaje de dopamina<sup>10</sup>. Sin embargo, existen otros radiotrazadores que pueden evaluar otros aspectos del sistema dopaminérgico. Uno de ellos es la <sup>11</sup>C-(+)- $\alpha$ -dihidrotetabenazina (<sup>11</sup>C-(+)DTBZ), un marcador de los transportadores de monoaminas VMAT2 que se localizan en las vesículas presinápticas de las neuronas de dopamina<sup>11</sup> y que ya ha sido utilizado en estudios clínicos de la EP<sup>12,13</sup>. Estos trabajos revelan que la <sup>11</sup>C-(+)DTBZ refleja más fielmente la pérdida dopaminérgica en la EP que otros radiofármacos, ya que las compensaciones secundarias a pérdidas parciales de innervación o las alteraciones del sistema por la influencia de tratamientos farmacológicos afectan a la actividad AADC y a otros elementos como los receptores DAT<sup>12,14</sup>. Sin embargo, la expresión de VMAT2 en las terminales dopaminérgicas no se ve alterada por estos tratamientos farmacológicos ni está regulada por la síntesis de dopamina<sup>14,15</sup>.

Aunque la capacidad e idoneidad de la <sup>11</sup>C-(+)DTBZ como marcador PET de actividad dopaminérgica presináptica ya ha sido confirmada en estudios con pacientes, el objetivo de este trabajo es valorar la utilidad de este radiotrazador en estudios microPET de los modelos animales citados anteriormente, observando su biodistribución e implementando un método de cuantificación mediante la generación de imágenes paramétricas y medida del potencial de unión (BP).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Síntesis $^{11}\text{C}$ -(+)*DTBZ**

En este estudio se ha utilizado el isómero (+)- $\alpha$ -*DTBZ*, ya que el enantiómero (-)- $\alpha$ -*DTBZ* no presenta afinidad por los VMAT2 y causa que el uso de la mezcla racémica disminuya la especificidad y reduzca el contraste de las imágenes obtenidas<sup>14</sup>.

La síntesis de  $^{11}\text{C}$ -(+)*DTBZ* se llevó a cabo utilizando el módulo Tracerlab FXc de General Electric (versión Nuclear Interface), mediante un método automático que se compone de una secuencia de pasos dependientes del tiempo. El [ $^{11}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> se produjo mediante la reacción  $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$  en un ciclotrón Cyclone 18/9 (IBA), bombardeando una mezcla de  $^{14}\text{N}$  con 0,5% de O<sub>2</sub>. Tras el bombardeo se transfirió el gas radiactivo al módulo de metilación donde se produjo la reducción con LiAlH<sub>4</sub> en THF, posteriormente se incrementó la temperatura del reactor, momento en el que se adicionó HI para producir  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ , que se utiliza como precursor primario, y se destiló hasta el segundo reactor donde se coloca el precursor de la síntesis [(+)*desmetildihidrotetrabenazina*] disuelto en DMSO y KOH. La purificación final se llevó a cabo mediante dos cartuchos de alúmina y la evaporación de disolventes mediante evaporación. El producto final se esterilizó a través de un filtro de 0,22 $\mu\text{m}$ .

### *Animales*

Los estudios *in vivo* se realizaron en rata y mono, que son las especies más utilizadas como modelos animales para el estudio de la EP.

En el caso de los estudios con ratas, se utilizaron 10 animales control y dos ratas lesionadas unilateralmente a nivel del estriado mediante una inyección esterotáxica de 6-OHDA donde el hemisferio sano sirvió de control interno del estudio. Con el objeto de obtener lesiones de diferente grado, una de las ratas se lesionó con una inyección de 8  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA en el haz nigroestriatal (lesión total), mientras que al otro animal se le sometió a una inyección intraestriatal de 5  $\mu\text{g}$  (lesión parcial). Todos los animales (controles y tratados) fueron estudiados con el marcador  $^{11}\text{C}$ -(+)*DTBZ*, mientras que los estudios con  $^{18}\text{F}$ -DOPA sólo se realizaron en 2 ratas pertenecientes al grupo control y en

una de las ratas lesionada con 6-OHDA. Una hora antes de los estudios con  $^{18}\text{F}$ -DOPA se administró oralmente una mezcla de carbidopa (inhibidor de la DOPA descarboxilasa periférica)<sup>16</sup> (2 mg/100 g) y entacapona (inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa)<sup>17</sup> (30 mg/kg). Para asegurar la inmovilización durante todos los estudios microPET, las ratas fueron anestesiadas inhalatoriamente mediante isoflurano (2% de isoflurano en 100% de  $\text{O}_2$ ). Por último, otros dos animales control fueron utilizados para estudios de autorradiografía digital cuantitativa *in vitro*.

Los estudios con monos sólo se llevaron a cabo con el radiotrazador  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ, utilizándose dos ejemplares machos sanos de la estirpe *Macaca fascicularis*. Tras los estudios basales, uno de los monos fue tratado dos veces con el tóxico MPTP con un régimen de 0,5 mg/kg cada 15 días. Tras esperar la estabilización de la lesión se realizó otro estudio PET. Durante la adquisición del estudio PET los monos se anestesiaron mediante vía intramuscular con una mezcla de 10 mg/Kg de ketamina y 1 mg/Kg de midazolán.

Todos los procedimientos llevados a cabo con los animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Navarra según la normativa vigente.

### ***Estudios microPET***

El equipo utilizado fue un tomógrafo Mosaic de Philips, con una resolución de 2 mm y un campo axial de 11,9 cm y transaxial de 12,8 cm. Los animales fueron anestesiados y colocados en la camilla con el cerebro centrado en el campo de visión en posición prono. En el caso de los estudios en monos, previamente a los estudios de emisión se realizó una transmisión con una fuente externa de  $^{137}\text{Cs}$  de 10 mCi. La actividad (75 MBq) se inyectó vía intravenosa en la cola (ratas) o en la vena safena (monos) simultáneamente al comienzo de un estudio dinámico modo lista de 40 minutos en el caso de la  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ y 100 minutos en el caso de la  $^{18}\text{F}$ -DOPA.

La adquisición modo lista permite la reordenación de la información en tantas secuencias temporales como se desee y la creación de los senogramas correspondientes. Para cada estudio se creó un senograma de todo el intervalo de emisión a partir del cual se reconstruyó una imagen suma que recogía toda la información del estudio.

Posteriormente, se crearon senogramas dinámicos. En el caso de los estudios de  $^{11}\text{C}$ - (+)DTBZ en ratas, la secuencia temporal fue de 25 imágenes (6 x 30''; 5 x 60''; 12 x 120''; 2 x 240''), mientras que la deficiente calidad de las imágenes suma con  $^{18}\text{F}$ -DOPA no aconsejó el análisis posterior. En el caso de los monos, los senogramas dinámicos para la  $^{11}\text{C}$ - (+)DTBZ fueron de 16 *frames* (7x30''; 4x120''; 5x300''). A partir de estos senogramas se generaron imágenes dinámicas que contenían la información de las correspondientes franjas temporales. Todas las imágenes, tanto suma como dinámicas, se reconstruyeron mediante un algoritmo 3D Ramla y aplicándose las correcciones de tiempo muerto, decay y dispersión, además de atenuación para los estudios con monos.

### ***Cuantificación de las imágenes PET***

La cuantificación de los estudios se llevó a cabo mediante el análisis de imágenes paramétricas creadas a partir de las imágenes de actividad obtenidas con el equipo Mosaic. Estas imágenes paramétricas poseen información sobre un parámetro biológico que depende del radiotrazador utilizado y que en el caso de la  $^{11}\text{C}$ - (+)DTBZ se corresponde con el potencial de unión (*binding potential*: BP) del transportador VMAT2, el cual refleja la densidad de este transportador en una determinada región. La creación y análisis de las imágenes paramétricas se llevó a cabo con el programa informático especializado PMOD (versión 2.5), lo que requirió la exportación de los estudios mediante un formato Dicom según la metodología previamente descrita en nuestro grupo<sup>18</sup>.

Los pasos que se siguieron para el análisis de las imágenes fueron iguales para los estudios en ambos modelos animales y se resumen a continuación. Sobre la imagen suma correctamente reorientada se dibujaron las regiones de interés (ROIs) en una región de captación específica (estriado izquierdo y derecho) y en una región de captación no específica o región de referencia, que en la rata se situó en el cerebelo y en los monos en la corteza occipital. Posteriormente las ROIs se trasladaron a la imagen dinámica, permitiendo obtener las curvas actividad-tiempo para cada región. Las imágenes paramétricas de BP se obtuvieron mediante un modelo multilíneal de tejido de referencia<sup>19</sup> donde la linealización se realizó utilizando únicamente los 25 últimos minutos del estudio. Por último, el valor de BP se calculó aplicando las ROIs de los



ganglios basales sobre las imágenes paramétricas. Como valor final se promediaron los valores de ambos estriados. También se calculó la simetría interestriatal como el cociente estriado izquierdo/estriado derecho.

En el mono tratado con MPTP se corrigió la imagen PET tras el tratamiento con la imagen del estudio basal utilizando las herramientas ofrecidas por el mismo programa PMOD. De esta manera se pudieron utilizar las mismas ROIs para el cálculo del BP en ambos estudios.

#### ***Autorradiografía digital cuantitativa in vitro:***

Se utilizaron cortes coronales de cerebro de rata de 20  $\mu\text{m}$  de espesor preparados con un criotomo (HM550, Microm) y montados en portas especiales para cortes congelados (SuperFrost Plus, Menzel-Glaser). Los cortes fueron recogidos a diferentes niveles de estriado (bregma 0,48 a -0,26) y guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Los cortes elegidos para el estudio fueron descongelados al aire una hora antes de comenzar la técnica y preparados en un coplin. En ese momento se añadió 50 mL de buffer de incubación (HEPES 20 mM pH=8.0 300 mM sacarosa) al que se había añadido 18,5 MBq de  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, los cortes fueron lavados con un buffer Tris HCL 4,0 mM pH=8,0 a  $4^{\circ}\text{C}$  (2 veces durante 2 minutos), enjuagados con agua destilada fría y secados rápidamente con la ayuda de un secador. Los cortes fueron expuestos en una placa de autorradiografía (Imagin plate BAS-SR 2025, Fujifilm) durante 20 minutos, tras los cuales la placa se leyó en un escáner BAS 5000 (Fujifilm).

La incorporación de  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ se cuantificó con la ayuda de un programa especializado (Aida Image Analyzer, Raytest) mediante el dibujo de regiones de interés en la zona del estriado y corteza donde se midió la cantidad de PSL/ $\text{mm}^2$  (PSL: photo-stimulated-luminescence). La intensidad de PSL registrada en las placas se transformó a unidades de actividad (Bq) mediante la fabricación de unos estándares de  $^{11}\text{C}$  con piezas de papel de filtro de 5 mm x 5 mm que se expusieron de forma simultánea a los cortes de tejido<sup>20</sup>. Para ello se realizaron 6 diluciones seriadas de  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ tomando como dilución máxima aquella que se había añadido a los cortes. De cada dilución se

añadieron 2,5  $\mu\text{L}$  para empapar las piezas de papel. Para cada una de las actividades se realizaron 5 copias, 2 de las cuales se expusieron junto a los cortes, mientras que la actividad de los otros 3 duplicados fue medida en un contador gamma (Compugamma CS1282, Pharmacia). La cantidad de PSL/ $\text{mm}^2$  medida en los estándares expuestos a autorradiografía se correlacionó con la actividad teórica calculada para el momento de la exposición a la placa. Por otro lado, para asegurar que esta actividad teórica corresponde con la actividad real de los estándares, se correlacionó también la actividad teórica y la obtenida mediante medida directa de los duplicados con el contador gamma.

## RESULTADOS

Todos los estudios microPET en rata realizados con  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ dieron lugar a imágenes donde se pudieron localizar con seguridad ambos estriados al existir un alto contraste con respecto a otras estructuras cerebrales (Figura 1). Debido a la elevada descarboxilación periférica, las imágenes obtenidas con  $^{18}\text{F}$ -DOPA no discriminaron los estriados, por lo que no se procedió a un análisis posterior. En todas las ratas control, los estudios PET mostraban una captación simétrica en ambos estriados, mientras que en las ratas tratadas con 6-OHDA se observó una disminución total o parcial de la captación en el lado lesionado dependiendo del grado de la lesión. (Figura 2).

El análisis de los estudios dinámicos dio lugar a las curvas de actividad-tiempo que muestran una clara separación entre el estriado (captación específica) y cerebelo (región de referencia) (Figura 3). La valoración de estas curvas permitió la selección de la ventana temporal para la posterior cuantificación, que en el caso de la rata se estableció para el intervalo de 15 a 40 minutos.

Las imágenes obtenidas mediante autorradiografía *in vitro* confirman lo observado en los estudios PET. La figura 4.A. muestra una imagen autorradiográfica representativa donde se observa que la unión de  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ se localiza en estriado de la rata mientras que el resto de estructuras cerebrales presentan una captación mucho menor. La utilización de estándares de  $^{11}\text{C}$  permite cuantificar la actividad del estriado (56,01 Bq) al poder correlacionar la medida de PSL/ $\text{mm}^2$  con la actividad teórica calculada en el momento de la exposición a la placa autorradiográfica, ya que existe una buena correlación entre los valores de PSL de los estándares expuestos a la placa y los valores de actividad ( $r^2=0,994$ ) (Fig 4.B). A su vez la actividad de los estándares calculada teóricamente se correlacionó con la actividad real de los duplicados medida en el contador gamma ( $r^2=0,996$ ) (Fig 4.C.).

El análisis cuantitativo de la captación de  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ se llevó a cabo mediante el cálculo del parámetro biológico BP. Como valor final (promediando a su vez los valores de ambos estriados) se obtuvo un valor de  $1,10\pm 0,16$  (media $\pm$ EEM) para una población de  $n=10$ , mientras que el promedio de la simetría interestriatal (calculada como estriado izquierdo/estriado derecho) fue de  $1,02\pm 0,05$ . En los animales tratados con 6-OHDA la

lesión total dio lugar a una captación casi inapreciable con un valor de BP de 0,05, mientras que la lesión parcial produjo una disminución del 25% en la captación de  $^{11}\text{C}$ -DTBZ con respecto al estriado sano del mismo animal (Figura 2).

En el caso de los estudios con monos, al igual que en las ratas, todos los estudios con  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ generaron imágenes donde destacaban claramente ambos estriados, pudiéndose crear imágenes paramétricas de BP (Figura 5). Las curvas actividad-tiempo de  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ representadas en la Figura 6 muestran también una diferencia en el comportamiento de captación de este radiofármaco por parte de los ganglios basales con respecto a la región de referencia (corteza occipital). La dinámica de incorporación observada fue similar a la de la rata, por lo que se eligió el mismo intervalo temporal (15-40 minutos) para la cuantificación. En los dos ejemplares utilizados el valor del BP de  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ fue de 1,31 y 1,06. El cálculo de la simetría entre lado izquierdo y derecho fue de 1,06 y 1,01 respectivamente. El tratamiento con MPTP en uno de los monos produjo una reducción en la captación de la  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ de un 39,7% (Figura 7) sin que el animal presentase signos externos de afectación.

## DISCUSIÓN

Este trabajo muestra la utilidad del radiotrazador  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ para el estudio de actividad dopaminérgica en mono y rata. La  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ es un radioligando PET que se une específicamente al transportador de monoaminas VMAT2 que se encuentran en las vesículas de todas las neuronas monoaminérgicas (serotonina, noradrenalina y dopamina)<sup>21</sup> por lo que las imágenes PET con este radiofármaco representan toda la innervación monoaminérgica cerebral. Sin embargo, ya que la innervación por parte de neuronas de dopamina en el estriado supone aproximadamente un 90% del total<sup>22</sup>, se asume que las imágenes PET con  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ en esta estructura permiten evaluar el estado de la innervación dopaminérgica<sup>12,14</sup>.

En ambas especies, rata y mono, se han obtenido imágenes donde resalta claramente el estriado con respecto a otras zonas cerebrales pudiendo realizarse el análisis cuantitativo posterior. Su idoneidad está apoyada por la cinética de captación de la  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ observada en las curvas actividad-tiempo, la alta simetría inter-estriatal y la disminución de captación en los estriados lesionados con 6-OHDA o MPTP. La utilidad de este radiotrazador en estos modelos animales ha sido confirmada recientemente en sendas publicaciones<sup>23,24</sup>. En su trabajo, Doudet et al. comparan la efectividad de la DTBZ con respecto a la  $^{18}\text{F}$ -DOPA y [ $^{11}\text{C}$ ]d-threo-metilfenidato (+MP), un radiotrazador del transportador de dopamina, estudiando ejemplares de mono jóvenes y viejos y con diferente grado de lesión tras tratamiento con MPTP. La  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ es el único de los tres trazadores con la suficiente sensibilidad como para detectar las deplecciones del estriado producidas por lesiones leves asintomáticas de MPTP, por lo que concluyen que este es el radiofármaco más adecuado para trabajos que precisan detectar los efectos de distintos tratamientos de la EP.

El equipo microPET utilizado, con una resolución de 2 mm, resulta adecuado para la visualización del estriado de rata, que posee una anchura aproximada de 2-3 mm<sup>25</sup>. En este modelo las imágenes obtenidas con  $^{18}\text{F}$ -DOPA no son de calidad suficiente como para permitir su evaluación<sup>26</sup>, a pesar de haber utilizado distintas combinaciones de carbidopa y entacapona. Este hecho otorga más importancia al hallazgo de otros radiotrazadores que, como la  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ, pueden utilizarse para el estudio por imagen PET del sistema dopaminérgico en este modelo animal tan utilizado<sup>24</sup>. La gran

afinidad de la  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ al estriado de la rata se comprobó también mediante el estudio de autorradiografía *in vitro*. Para que este método pueda ser además cuantitativo, y debido al corto periodo de semidesintegración del  $^{11}\text{C}$ , se requiere la preparación de estándares para cada estudio individual. Hemos comprobado que existe una muy buena correlación entre la actividad teórica que corresponde a estos estándares y la que se mide en el contador gamma y también entre los valores de PSL y de actividad de los estándares. Esto permite una cuantificación absoluta fiable de la cantidad de actividad que se encuentra en una región de interés, en este caso el estriado, por lo que la aplicación de estas técnicas autorradiográficas supone un complemento ideal a los estudios de imagen *in vivo*.

En este estudio el análisis cuantitativo de la captación de DTBZ se ha realizado mediante el cálculo del BP utilizando una cuantificación basada en un modelo de tejido de referencia. Generalmente, la cuantificación absoluta de un parámetro biológico mediante imagen PET requiere la cuantificación exacta de la concentración de actividad en la sangre arterial, lo que proporciona la función de entrada para el modelo cinético requerido. Sin embargo, ya que éste es un proceso invasivo que supone una complicación metodológica añadida, existen una serie de aproximaciones que utilizan como función de entrada el comportamiento dado por un tejido de referencia sin captación específica. Múltiples estudios demuestran que eligiendo el método adecuado los datos aportados por este tipo de aproximaciones pueden sustituir satisfactoriamente la cuantificación absoluta del parámetro fisiológico a estudiar, en este caso el BP<sup>27</sup>. Este tipo de análisis se basa en la correcta elección del tejido de referencia. En el caso del mono, la región utilizada ha sido la corteza occipital, ya que se ha demostrado que esta región presenta una unión de  $^{11}\text{C}$ -(+)DTBZ lo suficientemente escasa como para ser utilizada como región de referencia<sup>28</sup>. En el caso de la rata, el tamaño del cerebro y la resolución del equipo impiden seleccionar con suficiente precisión esta zona, por lo que la estructura utilizada como región de referencia fue el cerebelo, el cual presenta una baja densidad de VMAT2 en roedores<sup>29</sup>. Los valores de BP para ambos modelos animales obtenidos mediante la metodología implementada (en torno a uno) se aproximan a aquellos obtenidos en humano, lo que indica que la densidad relativa de transportadores VMAT2 es similar en estas especies.

En conclusión, podemos afirmar que el radioligando  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ es indicado para la valoración cuantitativa de la inervación dopaminérgica en rata y mono. Además, la metodología de cuantificación utilizada permite el cálculo del BP de este transportador en las imágenes PET y por lo tanto estimar el estado de este sistema. Aunque son necesarios estudios más amplios, los primeros resultados en animales lesionados parecen indicar que la  $^{11}\text{C}$ -(+)-DTBZ es lo suficientemente sensible para detectar diferentes grados de pérdida en la inervación dopaminérgica. Así pues, este primer trabajo sienta las bases para la aplicación de la técnica PET en la investigación de nuevas terapias para la EP estudiadas en estos modelos animales.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Warner TT, Schapira A. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S16-23;.
2. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway. *Experimental Neurology.* 2002. 175: 303–317
3. Collier TJ, Steece-Collier K, Kordower JH. Primate models of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2003;183(2):258-62.
4. McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, et al. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2006;26(37):9365-75.
5. Iravani MM, Syed E, Jackson MJ, Johnston LC, Smith LA, Jenner P. A modified MPTP treatment regime produces reproducible partial nigrostriatal lesions in common marmosets. *Eur J Neurosci.* 2005;21(4):841-54.
6. Obinu MC, Reibaud M, Blanchard V, Moussaoui S, Imperato A. Neuroprotective effect of riluzole in a primate model of Parkinson's disease: behavioral and histological evidence. *Mov Disord.* 2002;17(1):13-9
7. Gouhier C, Chalon S, Aubert-Pouessel A, Venier-Julienne MC, Jollivet C, Benoit JP, et al. Protection of dopaminergic nigrostriatal afferents by GDNF delivered by microspheres in a rodent model of Parkinson's disease. *Synapse.* 2002;44(3):124-31.
8. Fearnley, JM, Lees, AJ. Aging and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991;114:2283–2301.
9. Brucke T, Djamshidian S, Bencsits G, Pirker W, Asenbaum S, Podreka I. SPECT and PET imaging of the dopaminergic system in Parkinson's disease. *J Neurol.* 2000;247 Suppl 4:IV/2-7.
10. Moore RY, Whone AL, McGowan S, Brooks DJ. Monoamine neuron innervation of the normal human brain: an 18F-DOPA PET study. *Brain Res.* 2003;982(2):137-45.
11. Koeppe RA, Frey KA, Vander Borght TM, Karlamangla A, Jewett DM, Lee LC, et al. Kinetic evaluation of [11C]dihydrotetabenazine by dynamic PET: measurement of vesicular monoamine transporter. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(6):1288-99.
12. Lee CS, Samii A, Sossi V, Ruth TJ, Schulzer M, Holden JE, et al. *In vivo* positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic



- dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2000;47(4):493-503.
13. Kumar A, Mann S, Sossi V, Ruth TJ, Stoessl AJ, Schulzer M, et al. [11C]DTBZ-PET correlates of levodopa responses in asymmetric Parkinson's disease. *Brain.* 2003;126 (Pt 12):2648-55.
  14. Bohnen NI, Albin RL, Koeppe RA, Wernette KA, Kilbourn MR, Minoshima S, et al. Positron emission tomography of monoaminergic vesicular binding in aging and Parkinson disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(9):1198-212 .
  15. De La Fuente-Fernandez R, Furtado S, Guttman M, Furukawa Y, Lee CS, Calne DB et al. VMAT2 binding is elevated in dopa-responsive dystonia: visualizing empty vesicles by PET. *Synapse.* 2003;49(1):20-8.
  16. Melega WP, Hoffman JM, Luxen A, Nissenson CH, Phelps ME, Barrio JR. The effects of carbidopa on the metabolism of 6-[18F]fluoro-L-dopa in rats, monkeys and humans. *Life Sci.* 1990;47(2):149-57
  17. Ruottinen HM, Rinne JO, Ruotsalainen UH, Bergman JR, Oikonen VJ, Haaparanta MT, et al. Striatal [18F]fluorodopa utilization after COMT inhibition with entacapone studied with PET in advanced Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1995;10(2-3):91-106.
  18. Martí-Clement JM, Collantes M, Peñuelas I, Álvarez-Erviti L, Blesa FJ, Ecay M et al. <sup>18</sup>FDOPA striatal uptake in Macaca fascicularis monkeys: Methodological development for a Mosaic microPET scanner. *Eur J Nucl Med.* 2006;33 (Suppl 14):S118.
  19. Ichise M, Ballinger JR, Golan H, Vines D, Luong A, Tsai S et al. Noninvasive quantification of dopamine D2 receptors with iodine-123-IBF SPECT. *J Nucl Med.* 1996;37(3):513-20.
  20. Ishiwata K, Ogi N, Tanaka A, Senda M. Quantitative *ex vivo* and *in vitro* receptor autoradiography using <sup>11</sup>C-labeled ligands and an imaging plate: a study with a dopamine D2-like receptor ligand [11C]nemonapride. *Nucl Med Biol.* 1999;26(3):291-6.
  21. Hoffman BJ, Hansson SR, Mezey E, Palkovits. Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* 1998 ;19(3):187-231.
  22. Wilson JM, Levey AI, Rajput A, Ang L, Guttman M, Shannak K et al. Differential changes in neurochemical markers of striatal dopamine nerve terminals in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology.* 1996;47(3):718-26.
  23. Doudet DJ, Rosa-Neto P, Munk OL, Ruth TJ, Jivan S, et al. Effect of age on markers for monoaminergic neurons of normal and MPTP-lesioned rhesus monkeys: a multi-tracer PET study. *Neuroimage.* 2006;30(1):26-35.

24. Strome EM, Cepeda IL, Sossi V, Doudet DJ. Evaluation of the integrity of the dopamine system in a rodent model of Parkinson's disease: small animal positron emission tomography compared to behavioral assessment and autoradiography. *Mol Imaging Biol.* 2006;8(5):292-9.
25. Paxinos, G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th Edition. Academic Press, 1998.
26. Hume SP, Lammertsma AA, Myers R, Rajeswaran S, Bloomfield PM, Ashworth S et al. The potential of high-resolution positron emission tomography to monitor striatal dopaminergic function in rat models of disease. *J Neurosci Methods.* 1996;67(2):103-12.
27. Grunder G, Siessmeier T, Piel M, Vernaleken I, Buchholz HG, Zhou Y et al. Quantification of D2-like dopamine receptors in the human brain with <sup>18</sup>F-desmethoxyfallypride. *J Nucl Med.* 2003;44(1):109-16
28. Koeppe RA, Frey KA, Kuhl DE, Kilbourn MR. Assessment of extrastriatal vesicular monoamine transporter binding site density using stereoisomers of [11C]dihydrotetrabenazine. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(12):1376-84.
29. Kilbourn MR, Frey KA, Vander Borght T, Sherman PS. Effects of dopaminergic drug treatments on in vivo radioligand binding to brain vesicular monoamine transporters. *Nucl Med Biol.* 1996;23(4):467-71.