



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**"El papel de los receptores dopaminérgicos estriatales
en las alteraciones conductuales en un modelo de la
enfermedad de Huntington"**

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

P R E S E N T A

Q.F.B. Itzel Vázquez Vidal

Dirigida por:

Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola

Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva

Juriquilla, Querétaro, Qro. México 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Itzel Vázquez Vidal cuyo título es: *"El papel de los receptores dopaminérgicos estriatales en las alteraciones conductuales en un modelo de la enfermedad de Huntington"* se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y que cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente Dra. Ma. Isabel Miranda Saucedo_____

Secretario Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola_____

Vocal Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos_____

Suplente Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez_____

Suplente Dr. José Jesús García Colunga_____

Aprobado por el Comité Académico

Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero
Coordinador del programa.

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Plasticidad Cerebral del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, bajo la dirección de la Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola. Este proyecto contó con el apoyo de PAPIIT-DGAPA IN225305-16, CONACYT 46161-M y una beca escolar No. 189355.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Magdalena Giordano Noyola, por su asesoría académica al igual que por su paciencia y apoyo.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Maribel Miranda, el Dr. Prado y la Dra. Giordano, por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto.

A el Ing. Elsa Nydia Hernández, Leopoldo Santos, M.V.Z. Martín García S. por su apoyo y en especial a Fernando Rodríguez por ayudarme con las cánulas y a cuidar mis ratas.

A mi familia: mi hermano David y a mi mamá por su apoyo y confianza.

A todos mis amigos... los que están, los que fueron y los que vendrán: Abraham, Jana, Claudia, Sol, Roberto (extrañaré esas fabulosas cenas y las platicas educativas en la hora de la comida); a los ataulfos Argel, carlos, ezquiél, irmá, angélica, carmen por su cariño; ana cristina, maya, victor; a mis amigas en SLP: Liliana, Mónica, Lesly y Gris... y sin faltar aquellos que están en mi MNS...muchas gracias por su apoyo, confianza, amor y amistad, hicieron que esta travesía fuera más ligera.

A Joel E. Vergara Quintanar.

Por compartir conmigo este reto del que tanto he
aprendido. Gracias por convertirte en mi amigo,
compañero y familia. TQM.

Nunca olvidaré esta frase... "Los límites de mi mundo son
los límites de mi lenguaje". Fco. Petrarca.

No hay montaña tan alta que pueda tapar el sol.

Proverbio Chino.

INDICE GENERAL

Página

RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
I - INTRODUCCIÓN.....	11
II - ANTECEDENTES.....	14
<i>II.1. Anatomía de los ganglios basales.....</i>	<i>14</i>
<i>II.2. Organización del estriado de la rata: Tipos de neuronas y receptores dopaminérgicos.....</i>	<i>15</i>
<i>II.3. Aferencias y eferencias estriatales.....</i>	<i>19</i>
<i>II.4. Fisiología de los ganglios basales.....</i>	<i>20</i>
<i>II.5. Trastornos de los ganglios basales.....</i>	<i>22</i>
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
IV. HIPÓTESIS.....	30
V. OBJETIVOS.....	31
<i>V.1. Objetivo general.....</i>	<i>31</i>
<i>V.2. Objetivos particulares.....</i>	<i>31</i>

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
<i>VI.1. Sujetos.....</i>	<i>32</i>
<i>VI.2. Implantación de cánulas.....</i>	<i>32</i>
<i>VI.3. Grupos y procedimiento de lesión.....</i>	<i>32</i>
<i>VI.4. Procedimiento de administración de los fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos D1/D2.....</i>	<i>33</i>
<i>VI.5. Histología.....</i>	<i>36</i>
<i>VI.6. Análisis estadístico.....</i>	<i>37</i>
VII. RESULTADOS.....	37
<i>VII.1. Histología.....</i>	<i>38</i>
<i>VII.2. Evaluación conductual de animales control y experimentales.....</i>	<i>40</i>
<i>VII.3. Evaluación conductual de la administración de los fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos D1/D2.....</i>	<i>41</i>
VIII. DISCUSIÓN.....	47
IX. CONCLUSIONES.....	51
X. REFERENCIAS.....	52
XI. ÍNDICE DE TABLAS.....	56
XII. ÍNDICE DE FIGURAS.....	56
XIII. ANEXOS.....	57

RESUMEN

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo que se genera por una pérdida gradual de neuronas GABAérgicas y gliosis en el núcleo del estriado y en menor medida en la corteza cerebral (Heimer, Zahm & Alheid, 1995). La información del estriado fluye hacia los núcleos de salida a través de dos vías: a) la vía directa formada por células GABAérgicas que expresan receptores dopaminérgicos tipo D1 y regulan la actividad de la sustancia nigra; y b) la vía indirecta formada por el mismo tipo neuronal pero que expresa receptores dopaminérgicos tipo D2 y regula la actividad del globo pálido (Smith, Bevan, Shink & Bolam, 1998). Los modelos excitotóxicos de la enfermedad de Huntington resultan en un incremento a corto plazo de la actividad locomotora espontánea en roedores (Mena-Segovia, Cintra, Prospero-Garcia, & Giordano, 2002). El propósito de este experimento fue determinar el papel del sistema dopaminérgico sobre la actividad locomotora; para esta finalidad se utilizaron ratas Sprague-Dawley que fueron implantadas con cánulas directamente en el estriado anterodorsal. Los animales control recibieron una administración intraestriatal del vehículo (solución amortiguadora de fosfatos, PBS 0.1 M) y los experimentales recibieron una inyección de ácido kaínico (5 nmoles/0.5 μ l). Se evaluó la actividad locomotora a los 7 días post lesión usando un sistema automatizado. Todos los animales recibieron una inyección bilateral intraestriatal de 7.5 μ g/ μ l SKF 38393 (agonista del receptor tipo D1), 2.5 μ g/ μ l quinpirol (agonista del receptor tipo D2), 5 μ g/ μ l SCH233990 (antagonista del receptor tipo D1), o de 5 μ g/ μ l eticlopride (antagonista del receptor tipo D2) en una primera infusión y del vehículo en la segunda infusión. Al finalizar el experimento los animales fueron perfundidos intracardialmente y la presencia de la lesión fue evaluada. Los resultados muestran que los animales lesionados fueron más activos que los controles; ambos grupos muestran un incremento en la actividad locomotora cuando se administra el agonista del receptor tipo D1 y disminuye con el antagonista del receptor tipo D1, sugiriendo la participación de la vía directa. Sin embargo tanto el agonista como el antagonista del receptor tipo D2 disminuyen la actividad locomotora en ambos grupos de animales.

I - INTRODUCCIÓN

Los ganglios basales son núcleos subcorticales que se encuentran dentro de los hemisferios cerebrales localizados en la base de cada hemisferio. Son núcleos de sustancia gris que forman parte del telencéfalo y están en relación cercana con el diencefalo (Waxman, 2001). Están compuestos principalmente por cuatro núcleos que son: el estriado (caudado y putamen), globo pálido, núcleo subtalámico y sustancia nigra (Kandel, Thomas & James, 1997); siendo el estriado el núcleo principal, debido a que recibe una importante inervación glutamatérgica proveniente de la corteza.

Según la hipótesis predominante, la información que procesan los ganglios basales fluye a través de dos sistemas que van hacia el tálamo: una vía directa, formada por los axones de las neuronas estriatales GABAérgicas que expresan receptores dopaminérgicos tipo D1 que proyectan hacia el núcleo entopeduncular (EP) y la sustancia nigra reticulata (SNr). El otro sistema es conocido como la vía indirecta, que está formado por los axones de las neuronas GABAérgicas que expresan receptores dopaminérgicos tipo D2 (Smith et al., 1998) que proyectan a través de núcleos intrínsecos (globo pálido y núcleo subtalámico) hacia el EP y SNr. Ambas vías ejercen efectos opuestos sobre el EP y la SNr, estas proyecciones terminan en varios núcleos del tálamo desde donde fibras eferentes se dirigen selectivamente hacia el lóbulo frontal. Desde éste influyen sobre el sistema motor y participan en el mantenimiento de la postura, la ejecución coordinada de movimientos, el inicio de la locomoción y la preparación del movimiento (Kandel et al., 1997).

Las alteraciones en el circuito de los ganglios basales, como es la degeneración de las neuronas estriatales con pérdida selectiva de neuronas GABAérgicas y degeneración de las capas más profundas de la corteza (principalmente la corteza frontal), conducen a cambios en el tono muscular y movimientos involuntarios (corea) característicos de la enfermedad de Huntington (Graybiel, 2000). Una importante aproximación para tratar de entender esta enfermedad neurodegenerativa ha sido el desarrollo de modelos animales apropiados que mimeticen las secuelas conductuales y neuroquímicas del trastorno (Pérez & Ríos, 2000).

Los modelos animales de la enfermedad de Huntington se realizan mediante la inducción de la muerte de células estriatales con un neurotóxico, siendo los más utilizados el ácido kaínico y el ácido quinolínico; los cuales producen muerte celular por excitotoxicidad y liberación de deshidrogenasa láctica, proceso que al parecer depende del calcio extracelular (Coyle, Murphy, Puttfarcken, Lyons & Vornov, 1991).

Estos animales exhiben principalmente una conducta anormal en términos de la actividad locomotora (hiperactividad) (Giordano & Mejia-Viggiano, 2001); presentan un incremento del tiempo de vigilia durante la fase de descanso (Mena-Segovia & Giordano, 2003) y deficiencias de aprendizaje (Scattoni, Valanzano, Popoli, Pezzola, Reggio & Calamandrei, 2004), trastornos que aparecen dependiendo del tiempo post lesión.

Dada la importante inervación dopaminérgica que reciben las neuronas estriatales, los efectos psicoestimulantes de los fármacos que inciden sobre este sistema y la exagerada respuesta a estos fármacos en animales lesionados, es de esperar que los receptores dopaminérgicos intraestriatales estén jugando un papel determinante en la hiperactividad motora que se observa después de la lesión estriatal con ácido kaínico.

Con la finalidad de determinar si el sistema dopaminérgico participa en estos cambios conductuales en este trabajo se utilizaron agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos en el modelo animal de la enfermedad de Huntington para deducir si la hiperactividad generada por las lesiones estriatales con ácido kaínico es regulada de forma diferencial por los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley y mediante cirugía estereotáxica se les implantaron cánulas sobre el estriado para posteriormente ser lesionadas con ácido kaínico (5 nmoles) y se utilizó un grupo control al que sólo se le administró una solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.1 M). A los 7 días post lesión, todos los animales recibieron una inyección bilateral intraestriatal del agonista D1 (SKF 38393) a una concentración de 7.5 µg/µl, del agonista D2 (quinpirol) a una concentración de 2.5 µg/µl, del antagonistas D1 (SCH 23390) a una concentración de 5 µg/µl y del antagonista D2 (eticlopride) a una concentración de 5 µg/µl y posteriormente se evaluó la actividad locomotora de los animales durante 2 horas utilizando un sistema automatizado. Todos los animales en

una primera sesión recibieron uno de estos fármacos y en una segunda ocasión recibieron una inyección del vehículo (solución salina) como control; siendo administrados de forma alternada.

Nuestros resultados muestran un incremento en la actividad locomotora de los animales lesionados en comparación con el grupo control en registros de 24 horas. La administración del agonista dopaminérgico D1 induce un incremento en la actividad locomotora mientras que la administración del antagonista dopaminérgico D1 induce una disminución en la actividad; así, estos resultados apoyan lo que se ha propuesto acerca del funcionamiento de la vía directa de los ganglios basales. Por otro lado, en cuanto a los receptores D2, los resultados indican que tanto su estimulación como su inhibición, resultan en una reducción de la conducta locomotora siendo todavía incierto el papel de estos receptores en el funcionamiento de la vía indirecta. Lo anterior nos lleva a proponer que las alteraciones en la actividad locomotora espontánea generada por la administración intraestriatal de ácido kaínico, son reguladas de forma diferencial por los receptores D1 y D2 y que esta regulación es semejante en los animales con lesiones estriatales y en animales control.

II - ANTECEDENTES

II.1. Anatomía de los ganglios basales

Los núcleos que componen a los ganglios basales son el estriado, formado por el núcleo caudado y el putamen, el globo pálido (con sus dos segmentos, interno y externo), el núcleo subtálamico en el diencefalo y la sustancia nigra (con sus dos segmentos, pars compacta y reticulata) en el mesencefalo (Smith et al., 1998). Sin embargo la nomenclatura de estos núcleos varía entre órdenes, por ejemplo en el caso de los primates y roedores.

En primates los núcleos caudado y el putamen se diferencian con claridad; se encuentran separados por una gran cantidad de fibras corticales descendentes (estructura denominada cápsula interna) que pasan por en medio de ambos y por eso es fácil distinguirlos. Ambos núcleos se desarrollan juntos a partir de la misma estructura prosencéflica y a los dos en conjunto se les denomina cuerpo estriado. En roedores el caudado y el putamen no son fácilmente distinguibles como en el caso de los primates, es por eso que su nomenclatura cambia. Las fibras de la cápsula interna son menos abundantes y no hay una verdadera separación entre el caudado y el putamen, por lo que se denomina caudado-putamen o estriado; otra nomenclatura para estos núcleos fue dada por Smith et al. (1998) en donde incluyen al núcleo accumbens y a estos tres núcleos juntos los denominan neostriado. El globo pálido también tiene equivalentes en roedores; el término de globo pálido (GP) se refiere de forma equivalente solamente al segmento del globo pálido externo (GPe) en primates, mientras que el núcleo entopeduncular (EP) es considerado homólogo al segmento del globo pálido interno (GPi) en primates (Parent & Hazrati, 1995) (Fig. 1).

Otras estructuras que componen a los ganglios basales como son la sustancia nigra y el núcleo subtalámico mantienen la misma nomenclatura en ambas especies. Principalmente estas diferencias sólo son en cuanto a la nomenclatura, debido a que se considera que la información que procesan los ganglios basales sigue el mismo principio en ambas especies. Para fines prácticos de nuestra investigación en adelante

haremos referencia a las investigaciones realizadas en roedores usando la nomenclatura correspondiente.

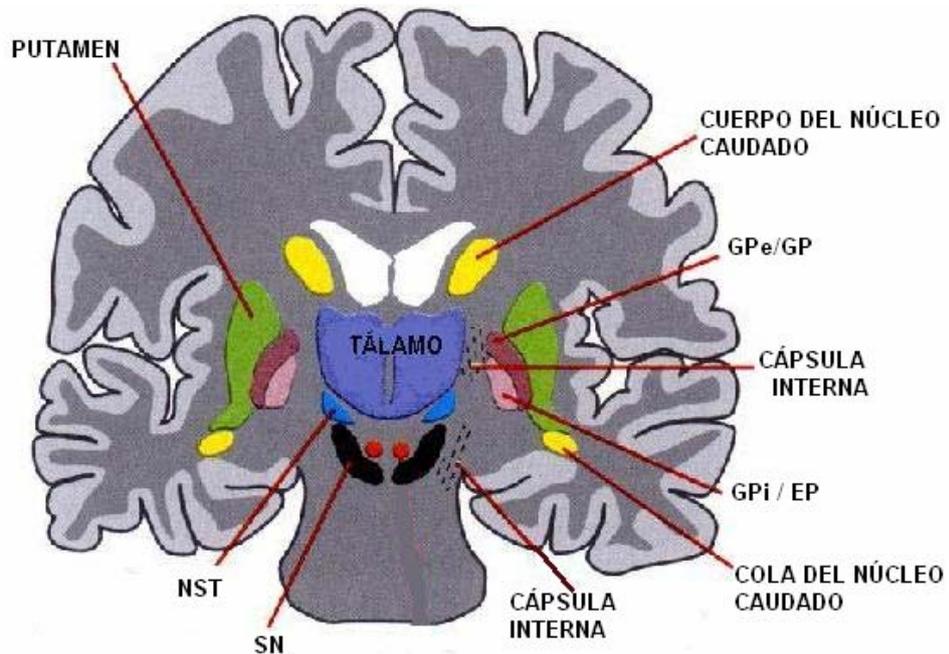


Fig 1. Esquema de los núcleos de los ganglios basales en primates. Abreviaturas: GPe: Globo pálido externo; GPI: Globo pálido interno; SN: Sustancia nigra; NST: Núcleo Subtalámico (GP: Globo pálido y EP: Núcleo Entopeduncular en roedores).

La información que procesan los ganglios basales proviene principalmente de toda la corteza, aunque también llega información del tálamo y del mesencéfalo; esta información es codificada mediante circuitos internos en los núcleos de los ganglios basales que se clasifican en tres tipos dependiendo de la información que procesan: de entrada, de salida e intrínsecos. Los núcleos que se consideran de entrada son los que comprenden el estriado; la sustancia nigra reticulata (SNr) y el núcleo entopeduncular (EP) se denominan núcleos de salida, mientras que la sustancia nigra compacta (SNc) y el globo pálido (GP) se denominan núcleos intrínsecos debido a que conectan entre sí a los núcleos de entrada y salida. Los núcleos blanco son el núcleo ventral anterior, ventral medial, dorso medial y centrolateral del tálamo; el colículo superior y la formación reticular pontina (Bargas, Galarraga & Aceves, 1998).

II.2. Organización del estriado de la rata: Tipos de neuronas y receptores dopaminérgicos.

El estriado está constituido por neuronas de proyección y por una diversa población de interneuronas. El 95% de sus neuronas son de un mismo tipo: medianas espinosas, cuyo neurotransmisor es el ácido- γ -aminobutírico (GABA); además co-expresan neuropéptidos como la sustancia P, la encefalina y la dinorfina; esta coexistencia de GABA con un determinado péptido en las neuronas espinosas está correlacionado con el sitio blanco de sus proyecciones (Bargas et al., 1998). Estas proyecciones se pueden clasificar en dos tipos; una población de neuronas GABAérgicas que se proyecta hacia los núcleos de salida expresa sustancia P, dinorfina y preferencialmente receptores dopaminérgicos tipo D1; mientras que el otro tipo son las neuronas que se proyectan al globo pálido que expresan encefalina y receptores dopaminérgicos tipo D2 (Bolam, Hanley, Booth & Bevan, 2000).

Estudios de localización muestran que los receptores D1 son receptores localizados a nivel postsináptico, más comúnmente en neuronas GABAérgicas medianas espinosas; mientras que los receptores D2 se encuentran localizados en ambos niveles, a nivel presináptico en neuronas dopaminérgicas en donde actúan como autoreceptores, en fibras aferentes no dopaminérgicas al estriado, entre las cuales están las terminales glutamatérgicas, y a nivel postsináptico en neuronas GABAérgicas (David, Anseau & Abbraini, 2005).

Las neuronas estriatales expresan múltiples tipos de receptores dopaminérgicos, los cuales por su estructura básica y propiedades farmacológicas se pueden diferenciar dos grandes grupos D1 y D2. Sin embargo, los recientes avances en genética molecular han permitido descubrir subtipos adicionales como son los receptores D3, D4 y D5, estas proteínas son relativamente menos abundantes y su localización cerebral es más restringida que los receptores clásicos D1 y D2 (Dziedzicka-Wasylewska, 2004).

De los cinco receptores, los receptores D1 y D2 se encuentran altamente expresados en el estriado adulto. Los receptores D1 se expresan en el estriado ventral y dorsal, además son detectables en el sistema límbico, hipotálamo y tálamo; este tipo de receptor no está presente en la SNr, EP y GP. La actividad del receptor D1 parece involucrar acciones

postsinápticas activando la respuesta mediada por receptores a glutamato, especialmente NMDA. En contraste, los receptores D2 se localizan en el estriado y en bajos niveles, en el globo pálido, en las células magnocelulares del núcleo rojo, en la porción caudal de la sustancia nigra, en la capa superficial del colículo superior, núcleo de raphe, dentro del núcleo trigeminal y en el área tegmental ventral. El receptor D2 podría involucrarse en acciones presinápticas regulando la liberación de glutamato de las terminales corticales (a través de la isoforma D2_S) y/o regulando post sinápticamente la respuesta de los receptores AMPA/Kainato (a través de la isoforma D2_L), modulando de esta manera la excitabilidad de las medianas espinosas (Centonze et al., 2004; Dziedzicka-Wasylewska et al., 2004; Walters, Ruskin, Allers & Bergstrom, 2000).

Los receptores D3 están localizados principalmente, aunque no exclusivamente, en estructuras límbicas; su secuencia de aminoácidos es similar a la que compone el receptor D2, sin embargo su acoplamiento a la adenilato ciclasa no es muy efectivo. Se ha identificado que tanto los receptores D4 como los D3 poseen semejanzas estructurales y morfológicas con los receptores D2, que se encuentran localizados en varias áreas cerebrales, abundantemente en la retina, corteza cerebral, hipotálamo y pituitaria, pero se encuentran relativamente bajos en el estriado. Los receptores D5 son similares a los receptores D1, se expresan principalmente en el hipocampo, en el núcleo mamilar lateral y en el núcleo parafascicular del tálamo (Dziedzicka-Wasylewska et al., 2004; Tarazi, Campbell & Baldessarini, 1998).

El otro tipo de neuronas que constituyen el estriado es una pequeña porción que corresponde al 2 y 3% del total de las neuronas estriatales denominadas interneuronas; éstas han sido identificadas mediante métodos citoquímicos, fisiológicos y morfológicos, que han permitido comprender los circuitos locales dentro del estriado.

La fisiología de las interneuronas del estriado no ha sido completamente relacionada con las características morfológicas y bioquímicas de las mismas, pero una de las clasificaciones más aceptadas es la de Kawaguchi et al. (1995), quienes asocian las características bioquímicas y fisiológicas para clasificarlas en tres grupos. El primer grupo incluye a las interneuronas de disparo rápido que contienen parvalbumina; este tipo de neuronas forma una red continua a través de sinapsis eléctricas que integran la información que recibe el estriado de la corteza a través de

sinapsis simétricas que se localizan en el soma y en el cuello de las dendritas de las medianas espinosas. Las sinapsis químicas entre ellas mismas se presume que son inhibitorias y que son responsables de la mayoría o de toda la inhibición que se observa en las neuronas estriatales de proyección.

El segundo grupo incluye a las interneuronas de bajo umbral dependiente de calcio y persistente despolarización que corresponden a células positivas a nicotin-adenin-dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-d); sus propiedades fisiológicas se adicionan al efecto generado por las interneuronas de disparo rápido antes mencionadas. Establecen sinapsis con el soma y con las dendritas de las neuronas medianas espinosas que incluyen a las neuronas de proyección que regulan la información que procede de entradas corticales y al parecer se especializan en la regulación de la actividad en el circuito local aunque no se excluye su acción sobre las entradas corticales.

Finalmente, el tercer grupo de neuronas son interneuronas con post hiperpolarizaciones prolongadas que expresan acetilcolin transferasa; su principal función es de asociación, lo que se atribuye a que relevan las señales de entrada de las aferencias dopaminérgicas hacia las neuronas estriatales de proyección (Onn, West & Grace, 2000). Estos grupos neuronales poseen propiedades específicas y diferentes entre sí; contribuyen a influenciar la actividad de las neuronas medianas espinosas que se refleja en última instancia en la conducta exhibida por el animal que se relaciona con el contexto que lo rodea (Tepper & Bolam, 2004).

II.3. Aferencias y eferencias estriatales

El estriado recibe una proyección masiva de la corteza cerebral; estas neuronas piramidales de proyección hacen sinapsis asimétricas principalmente en la cabeza de las espinas distales y algunos contactos en el cuello dendrítico de las neuronas medianas espinosas. Lei et al. (2004) mencionan que estas conexiones corticoestriatales pueden ser de dos tipos: las del tracto piramidal cuyas terminales hacen contacto preferencialmente con las neuronas estriatales que se proyectan a los núcleos de salida (EP y SNr); y la otra conexión corresponde a las conexiones intratelencefálicas cuyas terminales hacen contacto preferencialmente con las neuronas estriatales que se

proyectan al globo pálido. Estas proyecciones se encuentran topográficamente distribuidas, de forma que un área cortical determinada se proyecta al núcleo estriado más cercano formando un circuito cerrado a través del tálamo que regresa a la zona cortical donde se originó.

Otras aferencias importantes que recibe el estriado provienen de fibras glutamatérgicas tálamo-estriatales que hacen sinapsis asimétricas principalmente en la parte distal del árbol dendrítico; de neuronas dopaminérgicas de la SN que hacen sinapsis simétricas con las espinas de las dendritas distales y una alta proporción de ellas hacen contacto con el cuello dendrítico; de neuronas serotoninérgicas del núcleo de raphe cuyas aferencias forman sinapsis asimétricas en las espinas dendríticas o en el cuello de las neuronas estriatales; de neuronas adrenérgicas del locus coeruleus formando sinapsis en las espinas dendríticas y además de las interneuronas sin espinas intrínsecas del estriado que forman sinapsis asimétricas con toda la porción de las neuronas medianas espinosas; aproximadamente la mitad de estos botones colinérgicos hacen contacto en el cuello dendrítico, una tercera parte en las espinas dendríticas y una quinta parte hacen contacto en el soma neuronal (Heimer et al., 1995; Parent et al., 1995; Rhoades et al., 1995; Smith et al., 1998).

Con respecto a sus eferencias, las neuronas medianas espinosas son la principal fuente de axones estriatales eferentes que proyectan hacia 3 núcleos; GP, EP y SNr. Estas tres estructuras reciben una densa inervación GABAérgica proveniente del estriado; sólo el pálido ventral, el EP y la SNr recibe una densa inervación de proyecciones del estriado que expresan sustancia P, dinorfina y receptores D1, mientras que la parte dorsal del GP recibe una densa inervación encefalinérgica que expresa receptores D2 (Parent et al., 1995).

II.4. Fisiología de los ganglios basales

Los diversos núcleos que componen a los ganglios basales (se clasifican en núcleos de entrada, salida e intrínsecos) procesan la información proveniente de la corteza la cual emerge a través de ellos hacia el tálamo, modulando la actividad de las neuronas del circuito tálamo-cortical.

El circuito tálamo-cortical normalmente está sometido a dos tipos de influencias; una inhibitoria fásica que proviene de las neuronas estriatales y una excitatoria tónica proveniente del NST, lo que se vería reflejado como una activación de los núcleos de salida (SNr y EP) y una inhibición de los núcleos blanco. Para que se active este circuito se requiere de la activación de las neuronas corticoestriatales que liberan glutamato en las sinapsis con las neuronas medianas espinosas. El glutamato, al interactuar con los receptores del tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y los tipo AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) facilita la actividad de las neuronas medianas espinosas; las cuales poseen potenciales de reposo muy elevados (-80 mV) que las mantienen silentes.

La activación de estas neuronas permite la entrada a otras influencias excitatorias, siendo la dopamina la entrada más importante que facilita la transmisión de la información hacia los núcleos de salida (Marti, Mela, Bianchi, Beani & Morari, 2002).

Entre el núcleo de entrada (estriado) y los de salida existen dos sistemas paralelos de proyección originados en diferentes poblaciones neuronales del estriado denominados como "vía directa" y "vía indirecta"; el primer sistema está formado por los axones de las neuronas estriatales GABAérgicas que expresan preferencialmente receptores tipo D1 y se proyectan monosinápticamente a los núcleos de salida; la activación de esta vía genera una inhibición en la frecuencia de disparo de las neuronas de la SNr y del EP, lo que conduce a una desinhibición de los núcleos talámicos (Fig. 2).

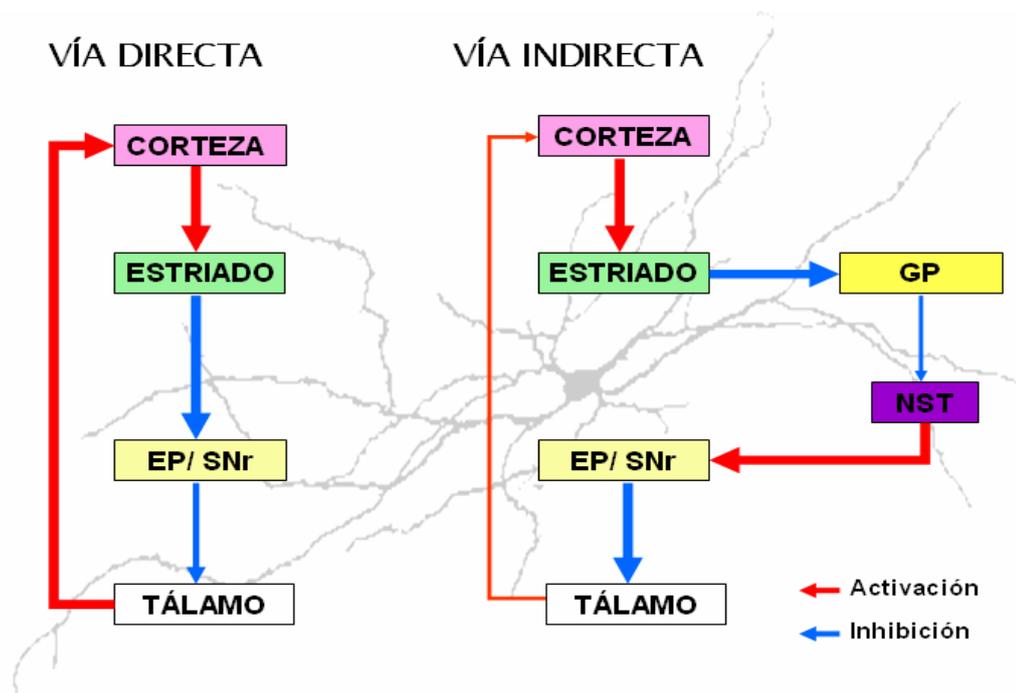


Fig 2. Representación gráfica del circuito de los ganglios basales. Abreviaturas: GP, globo pálido; NST, núcleo subtalámico; SNr, sustancia nigra reticulata y EP, núcleo entopeduncular. Las flechas rojas muestran el efecto excitatorio (activación) y las azules el efecto inhibitorio ejercidos sobre los núcleos; el grosor de las flechas indica el incremento o decremento de la actividad de los núcleos en el sistema.

En contraste, el otro sistema conocido como la vía indirecta está formado por los axones de las neuronas GABAérgicas que expresan receptores tipo D2, las cuales se proyectan primero al GP y a través de proyecciones GABAérgicas ejercen un efecto inhibitorio sobre el NST cuyas proyecciones glutamatérgicas hacen sinapsis sobre los núcleos de salida. La activación de esta vía tiende a suprimir la actividad del GP y por lo tanto a desinhibir al NST, lo que conduce a un aumento en la influencia excitatoria hacia los núcleos de salida e incrementa la inhibición de los núcleos blanco (Fig. 2) (Bargas et al., 1998; Bolam et al., 2000; Mena-Segovia et al., 2001).

Mediante ambas vías, los ganglios basales influyen sobre otros sistemas descendentes, tales como los sistemas corticoespinales y corticobulbares que descienden a la médula espinal y regulan la actividad de las motoneuronas espinales y al actuar sobre la corteza motora modulan la actividad motora y participan en el mantenimiento de la postura, la

locomoción y la preparación para el movimiento; además también influyen en los movimientos oculares por medio de una proyección adicional al colículo superior (Rhoades et al., 1995). Por otra parte, en los estudios realizados por Graybiel et al. (2000) se propone que los ganglios basales participan en diversas funciones cognitivas, tales como la memoria, el aprendizaje y la producción de respuestas habituales o automáticas.

II.5. Trastornos de los ganglios basales

Los defectos en la función de los ganglios basales (algunas veces denominadas lesiones extrapiramidales) se caracterizan por cambios en el tono muscular y movimientos involuntarios (corea). Los diversos movimientos anormales pueden incluir temblores (siendo de dos tipos, el temblor en reposo y el temblor postural que se presenta cuando el cuerpo es sostenido a una postura en particular), atetosis que se caracteriza por movimientos lentos, de contorsión de la musculatura de las extremidades y cuello, no relacionados con lesión específica, y corea, que consiste en movimientos rápidos, involuntarios y repetidos de los músculos distales de las extremidades, cara y lengua, mismos que, a menudo, acompañan a lesiones del cuerpo estriado (Pérez et al., 2000).

Una de las enfermedades más serias de los ganglios basales es la enfermedad de Huntington, la cual es un trastorno genético autosómico dominante que se caracteriza por un inicio insidioso, lento, seguido por movimientos debilitantes anormales (con mayor frecuencia corea; rigidez en los casos de inicio temprano) y disfunción cognoscitiva y psiquiátrica (Kandel et al., 1997; Waxman et al., 2001). La mutación que presentan los pacientes con la enfermedad de Huntington se localiza en el cromosoma 4 y consiste en un aumento del número de tripletes CAG que codifica la secuencia de poliglutamina en el N-terminal de la huntingtina; proteína con función vital en la embriogénesis del sistema nervioso pero de la que no se conoce una función específica. Parece existir una correlación entre el número de repeticiones y la edad de inicio: mientras más grande es el número de repeticiones de CAG, mayor es la probabilidad de un inicio temprano de la enfermedad (Cattaneo et al., 2003; Qin & Gu, 2004).

Para entender y tratar esta enfermedad neurodegenerativa, una importante aproximación ha sido el desarrollo de modelos animales apropiados que mimeticen las secuelas conductuales y neuroquímicas de la enfermedad de Huntington. Aunque estos modelos no pueden reproducir el complejo etiológico, fisiológico o las anormalidades conductuales asociadas con la enfermedad, proveen un método práctico para explorar preguntas específicas concernientes a la estructura y función.

En la actualidad los principales modelos animales que se utilizan son de dos tipos: los modelos genéticos y los farmacológicos. Los modelos genéticos se generan mediante la microinyección de una porción del un gen mutado, que expresa aproximadamente 155 repeticiones del triplete CAG que se introduce en el genoma del ratón. La expresión de este transgen puede ser evaluada mediante una prueba conductual (*feet clasping*) que consiste en sostener de la cola a los ratones. Los animales con el transgen sujetan las patas traseras con sus patas delanteras o extienden sólo sus patas traseras, mientras que el animal control extiende todas las extremidades. Neuroquímicamente estos ratones muestran cambios en los receptores a dopamina y glutamato en el estriado; además muestran alteraciones en las respuestas conductuales a estimulantes dopaminérgicos dependientes de la edad de los animales, mismas que han sido descritas en pacientes con la enfermedad de Huntington asintomáticos y sintomáticos (Pérez et al., 2000; Levine et al., 2004).

Los modelos farmacológicos de la enfermedad de Huntington se obtienen mediante la inyección de neurotoxinas específicas que inducen la muerte de células estriatales, siendo los más utilizados la inyección de ácido kaínico (AK) o de ácido quinolínico (AQ). Diversos autores han reportado que la muerte neuronal que inducen estas neurotoxinas ocurre en cuestión de días y las diversas alteraciones morfológicas se manifiestan de forma diferencial debido a las neurotoxinas.

El AK induce lesiones más localizadas que se caracterizan por la degeneración del soma y de las dendritas de las neuronas estriatales sin afectar a las fibras y axones terminales que pasan de fuentes externas. Tarazi et al. (1998) cuantificaron la pérdida de receptores dopaminérgicos después de la inyección de AK. Encontraron una pérdida de receptores dopaminérgicos tipo D1 de hasta el 75% y una pérdida de receptores tipo D2 de hasta el 44% a los 7 días post lesión. El AQ induce una extensa degeneración de neuronas de

proyecciones GABAérgicas estriatonigrales, estriatopalidales e interneuronas (Brickell et al., 1999; Foster et al., 2003), e induce una pérdida de receptores dopaminérgicos del 51% de receptores D1 y en un 20% de receptores D2 a la cuarta semana post lesión (Araujo et al., 2000; Cruz-Aguado et al., 2000). Debido a esto último la utilización de inyecciones de AK ofrece mayores ventajas debido a que se obtiene una máxima pérdida de receptores que se correlacionan con un incremento en la actividad locomotora de los animales.

Giordano y Mejia-Viggiano (2001) han descrito que después de una inyección con AK se observa un incremento en la actividad locomotora a los 7 días post lesión, alteración conductual que desaparece después de 30 días. Este tipo de lesiones excitotóxicas a pesar de ser una lesión aguda induce cambios a largo plazo; esto se demostró mediante retos farmacológicos. A pesar de que estos animales se comportaban de manera semejante a los animales control, aproximadamente entre 35 y 40 días post lesión, se observaron diversas alteraciones conductuales después de la administración de diversos fármacos. Cuando a estos animales se les administró amfetamina (fármaco que induce la liberación de dopamina de las terminales nigroestriatales e inhibe su recaptura) se incrementó la actividad locomotora siendo los animales lesionados más activos que los controles. Esta respuesta exagerada indica que existen déficits neurofarmacológicos que aún están presentes y la respuesta incrementada puede ser debida a la pérdida del control inhibitorio de los núcleos de salida de los ganglios basales.

Otra alteración conductual que se ha evaluado en animales lesionados con AK ha sido la alteración en el ciclo sueño-vigilia. El estudio realizado por Mena-Segovia et al. (2002) demostró que después de una lesión excitotóxica se induce hiperactividad locomotora sobre todo durante la fase de oscuridad y desaparece durante la fase de luz, resultados que han sido descritos previamente. Mena-Segovia et al., reportaron que durante la fase de luz y a tiempos más prolongados después de la lesión cuando ya no hay alteraciones motoras, se registran alteraciones en el sueño. El mecanismo por el cual ocurre esto no es claro pero proponen la existencia de una alteración en el circuito corteza-ganglios basales-tálamo-corteza, en cuyo caso las alteraciones del sueño podrían ser efecto de lesiones estriatales y de la pérdida de regulación de los núcleos de salida de los ganglios basales hacia el núcleo tegmental pedúnculo pontino (núcleo involucrado en el control

del ciclo sueño-vigilia), lo que produciría un incremento en la actividad del núcleo intralaminar del tálamo y la posterior activación cortical.

Hay reportes que indican que la dopamina juega un papel importante en el control de la excitabilidad de las neuronas medianas espinosas del estriado (las cuales se encuentran bajo influencia de entradas corticoestriatales y tálamocorticales) actuando como modulador de la eficiencia de la respuesta neuronal a entradas glutamatérgicas así como regulando en estas terminales la liberación de glutamato (Bamford et al., 2004; Kiyatkin et al., 1999).

En estudios electrofisiológicos realizados por Timmerman et al. (1998) en animales lesionados con AK se demostró que las infusiones estriatales de amfetamina y bajo condiciones de estimulación por glutamato inducían la inhibición del disparo de las neuronas de la SNr; lo que indica que la dopamina potenciaba el efecto inhibitorio en la tasa de disparo de las neuronas de los núcleos de salida de los ganglios basales, lo que se vería reflejado en el incremento en la actividad del tálamo. Estos resultados dan total validez al modelo de los ganglios basales y describen las alteraciones conductuales observadas en animales lesionados; sin embargo en animales normales el modelo actual de los ganglios basales no predice los efectos funcionales de la estimulación de los receptores para dopamina debido posiblemente a la complejidad del circuito.

Por otro lado en animales que no han sido lesionados, los estudios electrofisiológicos han permitido estudiar las influencias excitatorias bajo las cuales está el estriado, es decir entradas dopaminérgicas y glutamatérgicas principalmente. Además evalúan actividad del estriado con respecto a la de otros núcleos como en la SNr y núcleos intrínsecos como el GP, principalmente. Los resultados de estos estudios permiten plantear una hipótesis sobre la actividad de la red neuronal formada en los ganglios basales para influir sobre los núcleos blanco.

Para comenzar a analizar esta circuitería cabe mencionar los estudios realizados por Kiyatkin et al. (1999) en neuronas estriatales; estos estudios muestran que la liberación de dopamina tiene un efecto inhibitorio débil sobre la actividad espontánea de las neuronas estriatales dorsales y ventrales, efecto que es atenuado por la administración del antagonista D1 (SCH23390) y que incrementa robustamente la actividad

espontánea neuronal. Por otro lado este estudio demuestra que la administración del antagonista D2 (eticlopride) no induce una atenuación de la actividad espontánea causada por la acción de la modulación de los receptores D2. De esta manera parece ser que bajo condiciones conductuales relevantes la interacción de la dopamina con los receptores D1 ejerce una fuerte influencia inhibitoria sobre la actividad espontánea de las neuronas estriatales; mientras que la eliminación de esta influencia tónica podría ser responsable en parte del incremento en la excitabilidad neuronal encontrada después de la denervación dopaminérgica.

Por otro lado, este mismo estudio muestra que las señales tónicas de dopamina inducen cambios fásicos en la respuesta ante la entrada excitatoria glutamatérgica a la que están sometidas las neuronas medianas espinosas; en este caso la excitación inducida por el glutamato en las neuronas estriatales es menos pronunciada después de la administración del antagonista D1, datos que apoyan el rol de los receptores D1 en la mediación de los efectos de la dopamina en las neuronas estriatales.

Con respecto a la actividad de las neuronas de la SNr, estudios electrofisiológicos demuestran que una infusión bilateral de amfetamina en el estriado ventrolateral produce un incremento en la tasa de disparo de estas células más que una inhibición (Waszczak et al., 2001); este efecto no va de acuerdo con la hipótesis sobre el funcionamiento de los núcleos de los ganglios basales, debido a que en teoría la activación de los receptores D1 se traduciría en la inhibición de los núcleos de salida y desinhibición de los núcleos blanco (vía directa). Esta discrepancia podría deberse a que las neuronas de la SNr despliegan una alta variabilidad en el disparo, como lo demostraron Waszczak et al. en el 2002. En este mismo estudio se demuestra que las infusiones de agonistas en el estriado no inhiben consistentemente a las neuronas de la SNr pero infusiones de una mezcla de fármacos agonistas D1 y D2 causa un patrón mezclado de la respuesta neuronal que incluye excitación, inhibición e incluso hay poblaciones neuronales que no presentan cambios en su tasa de disparo, lo cual dificulta establecer el papel de los receptores dopaminérgicos sobre la actividad de las neuronas de la SNr y su manera de influir sobre los núcleos blanco.

En cambio, los estudios realizados en el GP muestran que después de la estimulación del estriado se reduce la transmisión GABAérgica de las medianas espinosas sobre el

GP, efecto modulado por los receptores D2. Aunque esto apoyaría la teoría de la vía indirecta de los ganglios basales, el papel de estos receptores es más difícil de caracterizar debido a que se encuentran pre y postsinápticamente lo que permite la modulación de la liberación tanto de dopamina como de glutamato. Se considera además la posibilidad de una cooperatividad entre receptores D1 y D2 en la actividad estriatal y en la respuesta a glutamato, mecanismo que es esencial en la mediación de los efectos de la señal dopaminérgica en las neuronas estriatales.

Otra estrategia que se ha utilizado para estudiar el sistema dopaminérgico ha sido mediante la expresión de c-Fos en la corteza y en el estriado; este marcador es de gran utilidad debido a que forma parte de una cascada de señalización que une al estímulo que llega a la membrana celular con la respuesta neuronal de los elementos efectores (Sheng & Greenberg, 1990).

Los estudios realizados por Steiner y Kitai (2000) demuestran que la inyección en el estriado del antagonista D1 (SCH23390), reduce significativamente la distancia recorrida de las ratas las cuales muestran poca actividad pero después de una inyección de apomorfina se incrementa la conducta. Estos cambios conductuales fueron evaluados en paralelo mediante la cuantificación de c-Fos. La inyección en el estriado del antagonista de los receptores D1 reduce los niveles basales de c-Fos y bloquea el incremento de c-Fos inducido por la administración de apomorfina (agonista dopaminérgico para los receptores D1 y D2); en la corteza se encontraron resultados similares aunque la expresión de c-Fos fue más robusta, lo cual sugiere que alteraciones en regiones específicas del estriado afectan largas porciones del mismo mediante mecanismos indirectos de retroalimentación involucrados en el circuito ganglios basales-corteza-ganglios basales; estos estudios nuevamente apoyan la teoría de la vía directa e indirecta.

Más tarde Blandini et al. (2003) mediante el uso del marcador c-Fos y la administración selectiva de fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos tipo D1 apoyan los resultados obtenidos por Steiner et al. en el 2000 demostrando que la administración del agonista de los receptores tipo D1 (SKF38393), induce un incremento en la expresión de c-Fos, efecto que fue contrarrestado por la administración sistémica del antagonista para el receptor D1 (SCH23390), lo que confirma que este fenómeno está mediado por

el receptor D1. Contrariamente, la estimulación de los receptores D2 a una dosis alta no induce la expresión de c-Fos en la corteza y en el estriado; sin embargo si se co-administra con el antagonista D2 (eticlopride) se induce expresión de c-Fos en el estriado contralateral y en la corteza en el lado ipsilateral a la inyección, resultados antes descritos por Adams y Keefe en el 2000 con una inyección sistémica de eticlopride. Los resultados indican que la estimulación o inhibición de los receptores D1 induce un claro efecto sobre la expresión de c-Fos como resultado de la activación de la vía directa; sin embargo tanto con la estimulación como con la inhibición de los receptores D2 se observa el mismo efecto lo que no apoya la hipótesis actual sobre el funcionamiento de la vía indirecta.

Estos estudios aunados a los estudios electrofisiológicos de las medianas espinosas definen el papel de los receptores dopaminérgicos en el funcionamiento de la vía directa e indirecta de los ganglios basales y cómo su actividad repercute a nivel conductal. Con respecto a lo anterior, los estudios conductuales han demostrado que la actividad locomotora no sólo se atribuye a los receptores dopaminérgicos en el estriado sino que se ha demostrado que el estriado se encuentra bajo una interacción funcional con otros núcleos.

Mena-Segovia y Giordano en el 2003, utilizando una inyección de amfetamina en el estriado, demostraron que se induce un incremento en la expresión de c-Fos en el núcleo tegmental pedúnculo pontino (NTPP) y se inducen alteraciones en el ciclo sueño-vigilia. Este núcleo es considerado como blanco de los núcleos de salida de los ganglios basales, el cual tiene conexiones con la SNc, el NST y el GP; una desinhibición del NTPP resulta en una excitación de las células dopaminérgicas de la SNc incrementando el flujo de dopamina al estriado, lo que podría ejercer una influencia en la actividad de los ganglios basales.

Los datos anteriores muestran la complejidad de la red neuronal de los ganglios basales; hay que considerar la interacción sinérgica entre los receptores que generalmente se requieren para la generación de toda la conducta o la respuesta electrofisiológica a la dopamina; además debemos considerar que las neuronas medianas espinosas se encuentran bajo diversas influencias como son sinapsis dopaminérgicas, colinérgicas o de las propias interneuronas del estriado, lo que podría generar una competencia

neuronal en la modulación de la actividad de estas vías (Guzman et al., 2003). Debido a esto ha sido difícil plantear una hipótesis acerca del papel de la dopamina en el funcionamiento de los ganglios basales, en particular por el hecho de que los receptores D1 y D2 se expresan en el estriado y en otros núcleos de los ganglios basales que directa o indirectamente influyen sobre los núcleos de salida; por todo esto ha sido complicado definir el papel de cada receptor aún usando agonistas selectivos para cada receptor para establecer cómo repercute su actividad en la conducta.

Sin embargo los estudios realizados en animales intactos muestran clara evidencia de la gran influencia dopaminérgica sobre la actividad estriatal y la interacción con otros núcleos; por lo tanto nos resulta de gran interés evaluar la contribución particular de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 en las alteraciones conductuales producto de la lesión estriatal con ácido kaínico (lo que genera el modelo animal de la enfermedad de Huntington). El análisis de la contribución particular de estos receptores a las anomalías conductuales, ayudará a dilucidar el papel de estas proteínas en el control de la conducta con la finalidad de evaluar la hipótesis de las vías directa e indirecta que se ha establecido a partir de estudios en animales intactos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que el sistema dopaminérgico participa de manera importante en las alteraciones de la actividad locomotora en animales con lesiones en el estriado como modelo de la enfermedad de Huntington, el propósito de este trabajo es contribuir a deducir el papel que juegan los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 sobre el control de la actividad locomotora en animales; con este fin, se hará uso de fármacos agonistas y antagonistas para estos receptores, con la finalidad de buscar estrategias terapéuticas que puedan reducir las alteraciones conductuales en este modelo animal que en su momento puedan ser aplicadas a pacientes con la enfermedad de Huntington.

IV. HIPÓTESIS

IV.1. La administración del agonista D1 SKF38393 inducirá un incremento en la actividad locomotora de los animales lesionados así como también en los animales control.

IV.2. La administración del antagonista D1 SCH23390 inducirá una disminución en la actividad locomotora de los animales lesionados así como también en los animales control.

IV.3. La administración del agonista D2 quinpirol inducirá una disminución en la actividad locomotora de los animales lesionados así como también de los animales control.

IV.4. La administración del antagonista D2 eticlopride inducirá un aumento en la actividad locomotora de los animales lesionados así como también de los animales control.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Deducir el papel de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en la hiperactividad producida por las lesiones intraestriatales con ácido kaínico, mediante su manipulación con agonistas y antagonistas dopaminérgicos.

V.2. Objetivos particulares

- V.2.1. Evaluar mediante técnicas histológicas a los animales control y a los animales lesionados con ácido kaínico.
- V.2.2. Demostrar el incremento en la actividad locomotora en los animales lesionados con ácido kaínico en comparación con la actividad registrada en los animales control.
- V.2.3. Demostrar el efecto del agonista SKF 38390 y del antagonista SCH 23390 para el receptor tipo D1 y del agonista quinpirol y del antagonista eticlopride para el receptor D2 sobre la actividad locomotora de los animales control y lesionados.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Sujetos: Ratas macho S.prague-Dawley (250-300 g), que se mantuvieron bajo ciclo invertido luz/oscuridad (luz encendida a las 9:00 PM); con libre acceso a la comida y al agua. Estos experimentos se realizaron entre las 12:00 PM y las 4:00 PM, durante el ciclo de oscuridad de los animales.

VI.2. Implantación de cánulas: Se preparó una mezcla de Ketamina (70 mg/kg) y Xilazina (6 mg/kg) para anestésiar a los animales. Se les inyectó 1 ml/kg de peso de esta mezcla vía intraperitoneal (i.p.). Una vez anestésiado el animal se colocó en el aparato estereotáxico y se realizaron dos trépanos en las coordenadas 1.2 mm antero posterior con respecto a bregma y \pm 2.6 mm medio lateral respecto a la línea media. En ambos hemisferios se insertó una cánula guía de 8 mm que sobresale 4 mm a partir del cráneo. Se aseguraron las cánulas al cráneo con tornillos y cemento dental. Se taparon con una cánula falsa del mismo tamaño de las cánulas; además se les inyectó vía intramuscular 0.5 ml de Penicilina (300,000 UI); finalmente los animales se dejaron recuperar durante una semana.

VI.3. Grupos y procedimiento de lesión: Después de la cirugía los animales se dividieron en dos grupos, aquellos que serían el grupo control y el grupo experimental. Una vez identificados los animales, a través de las cánulas implantadas se insertó un inyector de 10 mm de largo, el cual sobresalía 2 mm de éstas. Al grupo control se le administró en uno de los hemisferios 0.5 μ l de un amortiguador de fosfatos (PBS) y al otro grupo se le administró una dosis de 5 nmoles de ácido kaínico (AK), en el mismo volumen (dosis efectiva para producir daño estriatal; Giordano y Mejia-Viggiano (2001). La velocidad de infusión fue de 0.1 μ l/min durante 5 minutos dejando los inyectores 2 minutos más para permitir la difusión de las sustancias. Después de 4 horas a todos los animales se les inyectó el hemisferio contralateral de la manera antes descrita y una vez finalizada esta inyección se les administró vía intramuscular (i.m.) 0.1 ml de diazepam a una concentración de 5 mg/ml con la finalidad de prevenir la ocurrencia de convulsiones y de daño extraestriatal, sin inducir efectos en el estriado (ANEXO I).

Finalmente todos los animales se dejaron en recuperación durante una semana; en este tiempo se vigiló el peso de los animales y se les administró vía intradérmica (i.d.) 3 ml de Ringer-lactato durante 3 días. Al cuarto día post lesión, los animales se colocaron en las cajas de actividad locomotora en tres sesiones de 20 minutos en días no consecutivos, para su adaptación al lugar donde se desarrollaron los experimentos.

VI.4. Procedimiento de administración de los fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos D1/D2.

Una vez que concluyó el periodo de adaptación, se inició la inyección de los agonistas y antagonistas dopaminérgicos D1 y D2. Los animales recibieron inyecciones bilaterales intraestriatales de un volumen de 0.5 µl de los siguientes fármacos agonistas y antagonistas de los receptores D1 y D2; del agonista D1 SKF 38393 a una concentración de 7.5 µg/µl, del agonista D2 quinpirol (QNP) a una concentración 2.5 µg/µl, del antagonistas D1 SCH 23390 a una concentración de 5 µg/µl o del antagonista D2 eticlopride (ETICLOP) a una concentración 5 µg/µl. Todos los animales recibieron una inyección de solución salina (SS) como control. Cada animal recibió sólo dos inyecciones, una inyección del fármaco y del vehículo.

A los 7 días post lesión, se inició el registro de la actividad locomotora; diariamente se trabajó con 4 animales, dos animales control y dos animales lesionados los cuales recibieron inyecciones intraestriatales de agonistas y antagonistas dopaminérgicos D1 y D2, de tal manera que durante un experimento se incluían todos los tratamientos. La finalidad fue evaluar los efectos de estos fármacos sobre la actividad locomotora para las variables distancia total recorrida en centímetros y el número de movimientos verticales.

En un primer experimento se trabajó con la manipulación de los receptores tipo D1 mediante la administración de su agonista (SKF 38393) y del antagonista (SCH23390). En una primera sesión, los animales se colocaron en unas cajas de acrílico donde se les colocaron inyectores de 10 mm de largo y mediante una bomba de infusión se administraron los fármacos estando los animales en libre movimiento. Estos animales recibieron inyecciones bilaterales intraestriatales de un volumen de 0.5 µl del agonista de los receptores tipo D1 (SKF 38393), del antagonista de los receptores tipo D1

(SCH23390) o del vehículo (SS).

En la Tabla 1 se especifica el número de animales utilizados en cada grupo, la distribución de los animales y el tratamiento que recibieron durante cada sesión.

	PRIMERA INFUSIÓN	SEGUNDA INFUSIÓN
PBS (n=11)	SKF38393	SS
	SS	SKF38393
AK (n=12)	SCH23390	SS
	SS	SCH23390
PBS (n=13)	SCH23390	SS
	SS	SCH23390
AK (n=13)	SKF38393	SS
	SS	SKF38393

TABLA 1. Secuencia de administración de los fármacos agonista y antagonista dopaminérgicos para el receptor D1. Se muestran los animales control (PBS) y lesionados intraestriatalmente con ácido kaínico (AK) para el registro de la actividad locomotora durante el ciclo de oscuridad de los animales.

A todos los animales se les administró 0.5 µl de cada sustancia a una velocidad de 1 µl por minuto durante 5 minutos dejando los inyectores en el interior de las cánulas durante 2 minutos más para permitir la difusión de los fármacos; una vez transcurridos los 7 minutos que dura la inyección, los animales fueron colocados en las cajas de actividad locomotora durante 2 horas (de 12:00 PM a 14:00 PM y de 14:00 PM a 16:00 PM).

La actividad locomotora de los animales fue registrada usando un sistema automatizado (Digiscan Animal Activity System, AccuScan Electronics, Columbus OH), que promedia la actividad de los animales registrada durante 15 minutos, lo que se denomina una muestra; así al finalizar el registro de 2 horas tendremos 8 muestras para analizar y dos variables: distancia total en centímetros (DT) y el número de movimientos verticales (NMV).

A las 48 horas a los mismos animales se les administró una segunda infusión ya sea del fármaco o del vehículo como se especifica en la Tabla 1; evaluando la actividad

locomotora de los animales de la manera antes descrita.

Una vez que se concluyeron estos registros, se continuó con la manipulación de los receptores tipo D2 mediante la administración de su agonista (QNP) y del antagonista (ETICLOP). Nuevamente se organizaron grupos de 4 animales (incluyendo control y experimentales) que se colocaron en unas cajas de acrílico donde se les colocaron inyectores de 10 mm de largo y mediante una bomba de infusión se administraron los fármacos estando los animales en libre movimiento. En una primera sesión, los animales recibieron inyecciones bilaterales intraestriatales de un volumen de 0.5 μ l del agonista D2 (QNP), del antagonista D2 (ETICLOP) o del vehículo (SS), siguiendo el mismo procedimiento de inyección antes descrito. La distribución de los animales y el tratamiento que recibieron se muestra en la Tabla 2.

Después de 48 horas a los mismos animales se les administró una segunda inyección del vehículo o de los fármacos dopaminérgicos (QNP, ETICLOP o SS) como se especifica en la Tabla 2; evaluando la actividad locomotora de los animales de la manera antes descrita.

	PRIMERA INFUSIÓN	SEGUNDA INFUSIÓN
PBS (n=12)	QNP	SS
	SS	QNP
AK (n=9)	ETICLOP	SS
	SS	ETICLOP
PBS (n=8)	ETICLOP	SS
	SS	ETICLOP
AK (n=13)	QNP	SS
	SS	QNP

TABLA 2. Secuencia de administración de los fármacos agonista y antagonista dopaminérgicos para el receptor D2. Se muestran los animales control (PBS) y lesionados intraestriatalmente con ácido kaínico (AK) para el registro de la actividad locomotora durante el ciclo de oscuridad de los animales.

Al término de cada experimento los animales fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% (en solución de fosfatos; PB 0.1 M a pH 7.4); los cerebros se conservaron en sacarosa al 30% hasta el momento de obtener cortes de 50 μ m en un microtomo de congelación. Los cortes fueron teñidos con violeta de Nissl (para confirmar la lesión

excitotóxica y la ubicación de las cánulas en el estriado) y procesados con la técnica de citocromo oxidasa que permite visualizar la actividad metabólica celular y por lo tanto es un buen indicador del área lesionada (**ANEXO II Y III**).

VI.5. Histología: Se evaluó una serie de cortes de 50 µm separados 200 µm uno del otro (Fig. 3); todos los animales fueron evaluados por medio de criterios histológicos que fueron: a) la posición de las cánulas en el estriado anterodorsal en el caso de los animales control y experimentales y b) la lesión estriatal que se caracteriza por la pérdida celular, presencia de células picnóticas y pérdida de citoarquitectura característica del estriado en tinción de Nissl y el área de lesión evaluada por la tinción de citocromo oxidasa. Además se eliminaron los animales en donde la lesión se extendió hacia la corteza o el hipocampo.

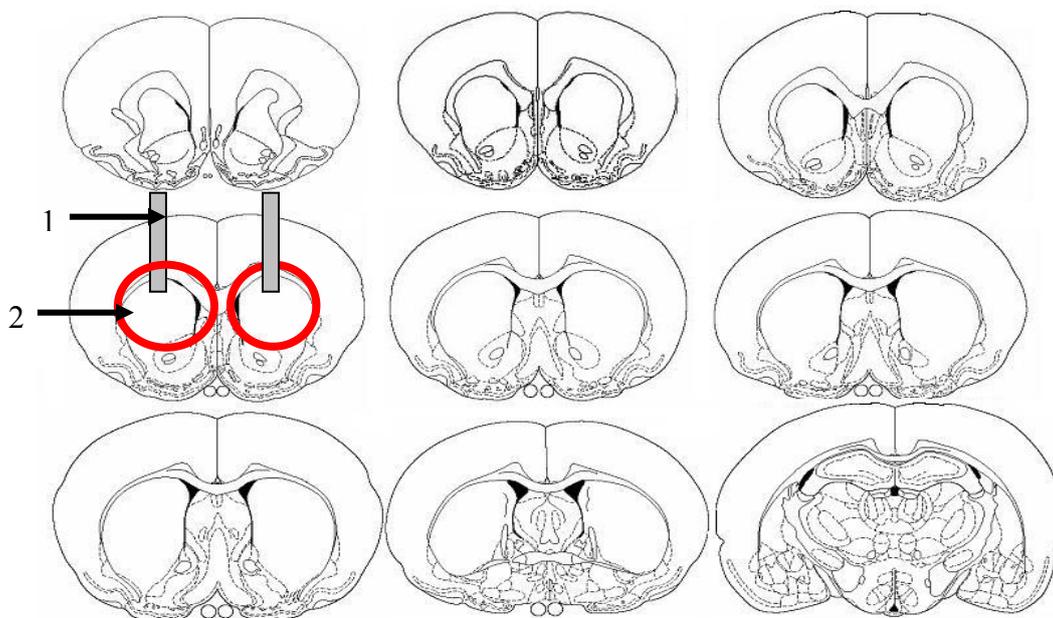


Fig. 3. Esquema de cortes coronales del cerebro de rata. Se muestra la posición de las cánulas en el estriado (1) y la extensión de la lesión (2) en el caso de los animales experimentales a los que se les administró AK.

VI.6. Análisis estadístico: Una vez realizado el análisis histológico de todos los animales, para el análisis estadístico sólo se incluyeron aquellos animales que cumplieron con los criterios de inclusión antes mencionados. El efecto de los fármacos fue analizado utilizando un análisis de varianza (ANDEVA) factorial de tres vías (grupo x fármaco x muestras), seguido de pruebas preplaneadas para determinar las diferencias entre los grupos. El valor de significancia para las pruebas fue de $P < 0.05$.

En cada uno de los experimentos, se reportan los promedios de la actividad durante 2 horas de registro y el error estándar de la media (EEM) para la variable de distancia total (DT) y el número de movimientos verticales (NMV). Se reportan también los valores de significancia encontrados de las comparaciones entre los grupos (PBS vs. AK), el efecto del fármaco administrado (SS vs. agonista o antagonista del receptor tipo D1 o D2) y el efecto encontrado entre las muestras (M1 vs. M2; M2 vs. M3 etc) que fueron tomadas durante las 2 horas de registro.

En las tablas se muestran los valores obtenidos después de la inyección del vehículo y el fármaco correspondiente, mientras que en las gráficas se compara el cambio neto en la actividad locomotora en respuesta a los distintos fármacos, se normalizó la actividad y se muestra el porcentaje de variación. Este porcentaje se obtuvo de la siguiente manera, se calculó la diferencia entre los datos obtenidos con el fármaco y los datos obtenidos con el vehículo y se expresó en términos de porcentaje de la actividad registrada; es decir si un grupo recorrió 100 cm al ser tratado con el vehículo y 50 cm al ser tratado con el fármaco se presenta como una actividad 50% menor

VII. RESULTADOS

VII.1. Histología

En la Fig. 4 y 5 se muestran esquemáticamente los resultados encontrados del análisis histológico. En la Fig. 4 se muestra la posición de las cánulas en los animales control y experimentales, las cuales se localizaron entre las coordenadas 1.60 – 1.20 mm anteroposterior con respecto a bregma, cortes que se muestran en A y B.

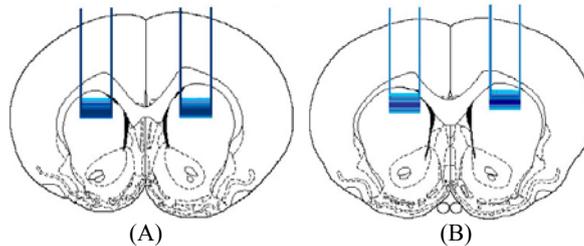


Fig. 4 Esquema de dos cortes coronales donde se representa la implantación de las cánulas en el estriado para los animales control y lesionados. A) coordenada 1.60 mm y B) 1.20 mm.

En la Fig. 5 se muestra la extensión de la lesión inducida por la administración de ácido kaínico; la lesión se localizó entre las coordenadas 1.50 – 0.48 mm con respecto a Bregma. La extensión máxima de lesión se localizó en la coordenada 1.60 mm antero posterior con una área máxima de 128.96 mm² y una mínima de 60.30 mm² obtenida por valores promediados de los dos hemisferios en cortes representativos.

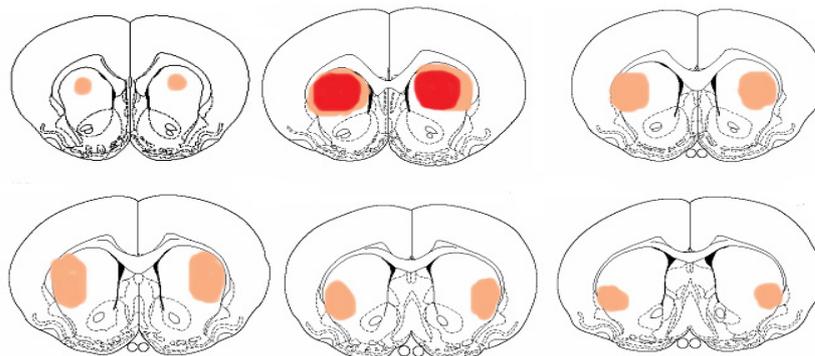


Fig. 5. Esquema de cortes coronales donde se representa la extensión de la lesión con ácido kaínico en los animales experimentales. La zona más oscura representa el valor máximo de la lesión y la zona donde concidió el mayor número de animales.

En cortes teñidos con citocromo oxidasa (Fig. 6A) se muestra la actividad metabólica en ambos estriados lesionados, la reducción en la intensidad en el área de la lesión y la presencia de los ventrículos dilatados indica muerte celular en esa área, misma que se confirmó con la tinción de Nissl y que se muestra a mayor amplificación. Es evidente en estas fotografías la pérdida de células, aumento de células picnóticas, que pueden representar tanto glía como células nerviosas muertas y la pérdida de la citoarquitectura del estriado por la desmielinización (Fig. 6B).

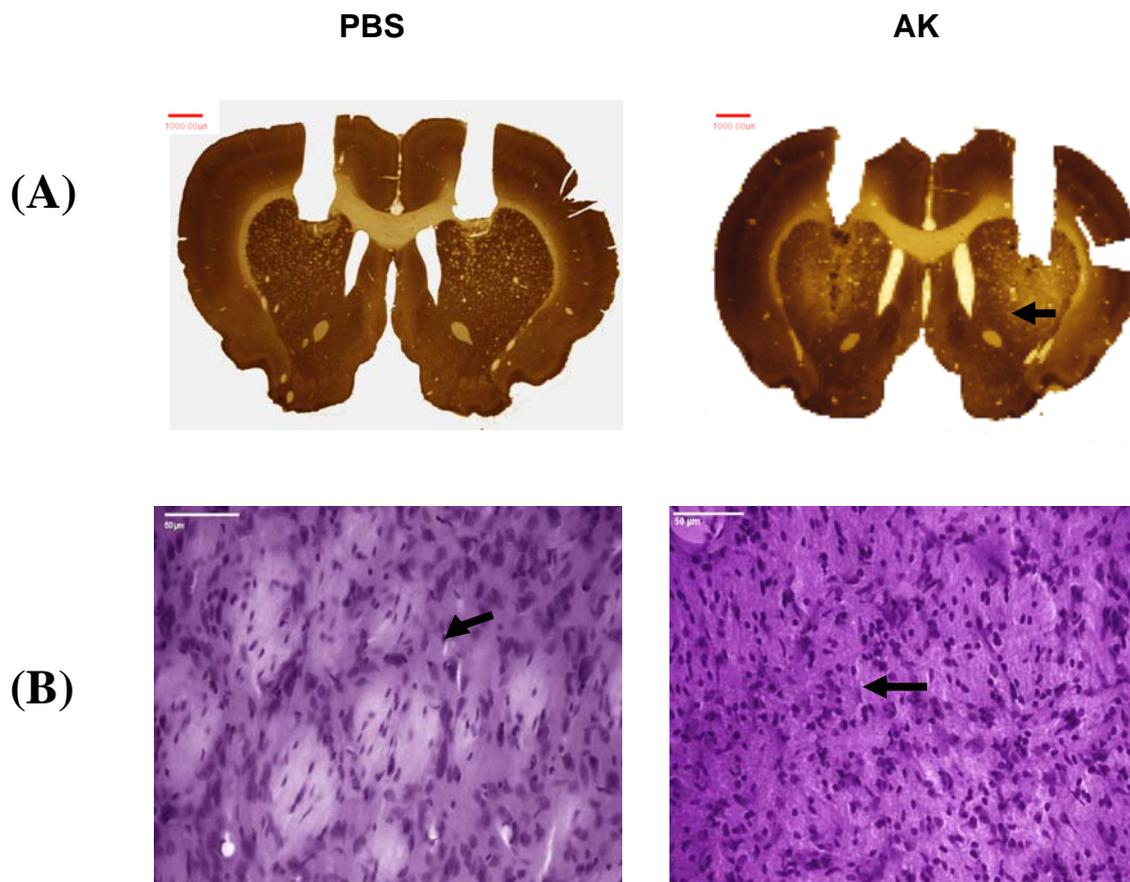


Fig. 6. Cortes coronales del estriado control (PBS) y experimental (AK). (A) Tinción citocromo oxidasa. La flecha marca la disminución en la reacción a la enzima citócromo oxidasa en el sitio de la lesión. (B) Tinción violeta de Nissl a 40X. En el grupo control (PBS), la flecha indica la presencia de neuronas intactas y en el grupo experimental (AK) la flecha indica muerte neuronal típica (células pequeñas). Barras de magnificación: A) 1 mm, y B) 50 μm.

VII.2. Evaluación conductual de animales control y experimentales

Después del análisis histológico de todos los animales, se evaluaron los registros de actividad locomotora a los 7 días post lesión. Todos los animales fueron registrados durante 24 horas para evaluar la actividad locomotora espontánea durante el ciclo luz-oscuridad; los resultados muestran que los animales que recibieron una inyección bilateral intraestriatal de ácido kaínico presentan valores más altos en distancia total recorrida que los animales control.

En la Figura 7 podemos observar que durante el periodo de oscuridad se registraron los valores más altos de actividad, donde las diferencias entre los grupos analizados son significativas [$F(1,17)=5.22$; $P=0.035$], mientras que durante la fase de luz (periodo de descanso) las diferencias desaparecen; comportamiento antes descrito por diversos autores (Giordano et al., 2001; Mena-Segovia et al., 2002).

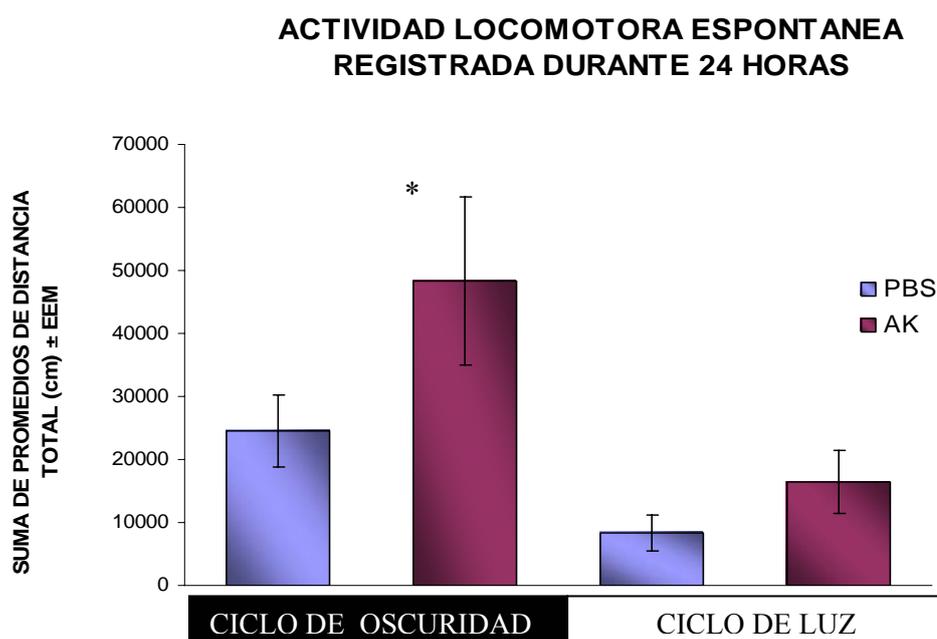


Fig. 7 Actividad locomotora espontánea. Promedio \pm EEM de la distancia total registrada a los 7 días post lesión durante 24 horas en un ciclo luz/oscuridad en animales control (PBS) y lesionados con ácido kaínico (AK). La barra negra significa el periodo de oscuridad (12 hrs.) y la barra blanca el periodo de luz (12 hrs). *Diferencias significativas $P < 0.05$ entre los grupos PBS vs. AK

VII.3. Evaluación conductual de la administración de los fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos D1/D2.

Una vez que finalizó el registro de actividad espontánea con una duración de 24 horas, a todos los animales se les administró en una primera sesión el vehículo (SS) y en una segunda sesión alguno de los cuatro fármacos dopaminérgicos como se estableció en el esquema de inyección antes mencionado (Tabla 1 y 2, Pág. 34 y 35) registrando la actividad locomotora de los animales durante 2 horas.

Evaluamos mediante un análisis estadístico el efecto de grupo (PBS vs. AK), el efecto del fármaco administrado (SS vs. agonista o antagonista del receptor tipo D1 o D2) y el efecto de las muestras (M1 vs. M2; M2 vs. M3 etc.).

En las tablas que se muestran a continuación se presentan los promedios de los resultados obtenidos de la actividad registrada durante las 2 horas de registro y el error estándar de la media para la variable distancia total (DT) y para el número de movimiento verticales (NMV) para todos los casos, mientras que los promedios obtenidos de cada una de las muestras no se presentan.

En la Tabla 3 se muestra la actividad locomotora de los animales a los 7 días post lesión después de la administración del vehículo y de la administración del agonista D1 SKF38393. Podemos observar que los promedios de los animales a los que se les administró ácido kaínico (AK) presentan valores más elevados que los registrados por los animales controles (PBS) en ambas variables (DT y NMV), siendo estas diferencias significativas [PBS vs. AK; $F(1, 22) = 4.30$; $P = 0.05$]; actividad que se incrementa después de la administración del agonista D1 SKF38393 tanto para animales controles como experimentales. Se encontraron diferencias significativas entre los fármacos administrados [SS vs. SKF38393; $F(1, 22) = 6.32$; $P = 0.019$] y no entre las muestras; mientras que para la variable NMV no se encontraron diferencias significativas entre los fármacos ni entre las muestras.

Distancia Total (cm)			Núm. Mov. Verticales		
DT			NMV		
	Vehículo (SS)	SKF38393		Vehículo (SS)	SKF38393
PBS (n=11)	624.11±73.28	1075.35±202.53	PBS (n=11)	12.28±3.02	15.89±4.55
AK (n=13)	955.77±228.9	1952.52±409.95*	AK (n=13)	17.07±3.44	27.09± 7.6

TABLA 3. Resultados de la actividad locomotora después de la administración del agonista D1 SKF38393. La tabla muestra el promedio \pm EEM de DT y del NMV registrados después de la administración de SS o SKF38390 en el estriado en animales control y lesionados. *Diferencias significativas $P < 0.05$ para el registro con SS vs. el fármaco en el mismo grupo.

Por otra parte, en la Tabla 4 se muestra la actividad locomotora de los animales a los 7 días post lesión después de la administración del vehículo y del antagonista D1 SCH23390, los datos muestran que los animales lesionados presentan valores más elevados DT y NMV en comparación a los del grupo control, sin embargo estas diferencias no son significativas entre los grupos (PBS vs. AK).

La administración del antagonista D1 SCH23390 indujo una disminución en la actividad locomotora de los animales tanto controles como experimentales; se encontró una diferencia significativa entre los fármacos administrados [SS vs. SCH23390; $F(1,23)=6.68$; $P=0.016$] en DT y en el NMV [$F(1,23)=6.64$; $P=0.019$]. Además se encontraron diferencias significativas entre las muestras para ambas variables (DT y NMV; $F(7,119)=3.51$; $P=0.001$ y $F(7, 119)=3.97$; $P=0.0001$; respectivamente), datos que se muestran en la Tabla 4.

Distancia Total (cm)			Núm. Mov. Verticales		
DT			NMV		
	Vehículo (SS)	SCH23390		Vehículo (SS)	SCH23390
PBS(n=9)	868.92±401.69	410.46±236.5*	PBS	24.84±10.67	5.89±2.48*
AK (n=11)	1053.75±432.16	260.09±103.22*	AK	18.59±4.34	10.00±4.13

TABLA 4. Resultados de la actividad locomotora después de la administración del antagonista D1 SCH23390. La tabla muestra el promedio \pm EEM de DT y del NMV registrados después de la administración de SS o SCH23390 en el estriado en animales control y lesionados. *Diferencias significativas $P < 0.05$ para el registro con SS vs. el fármaco en el mismo grupo.

Para comparar a simple vista el cambio neto de la actividad locomotora en respuesta a los fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos D1, en la Fig. 8 se muestra el porcentaje de variación en la actividad motora en términos de la DT y el NMV durante 2 horas de registro de los animales con vehículo (PBS) y con ácido kaínico (AK). Nótese que la diferencia del efecto de cada fármaco es similar en ambos grupos.

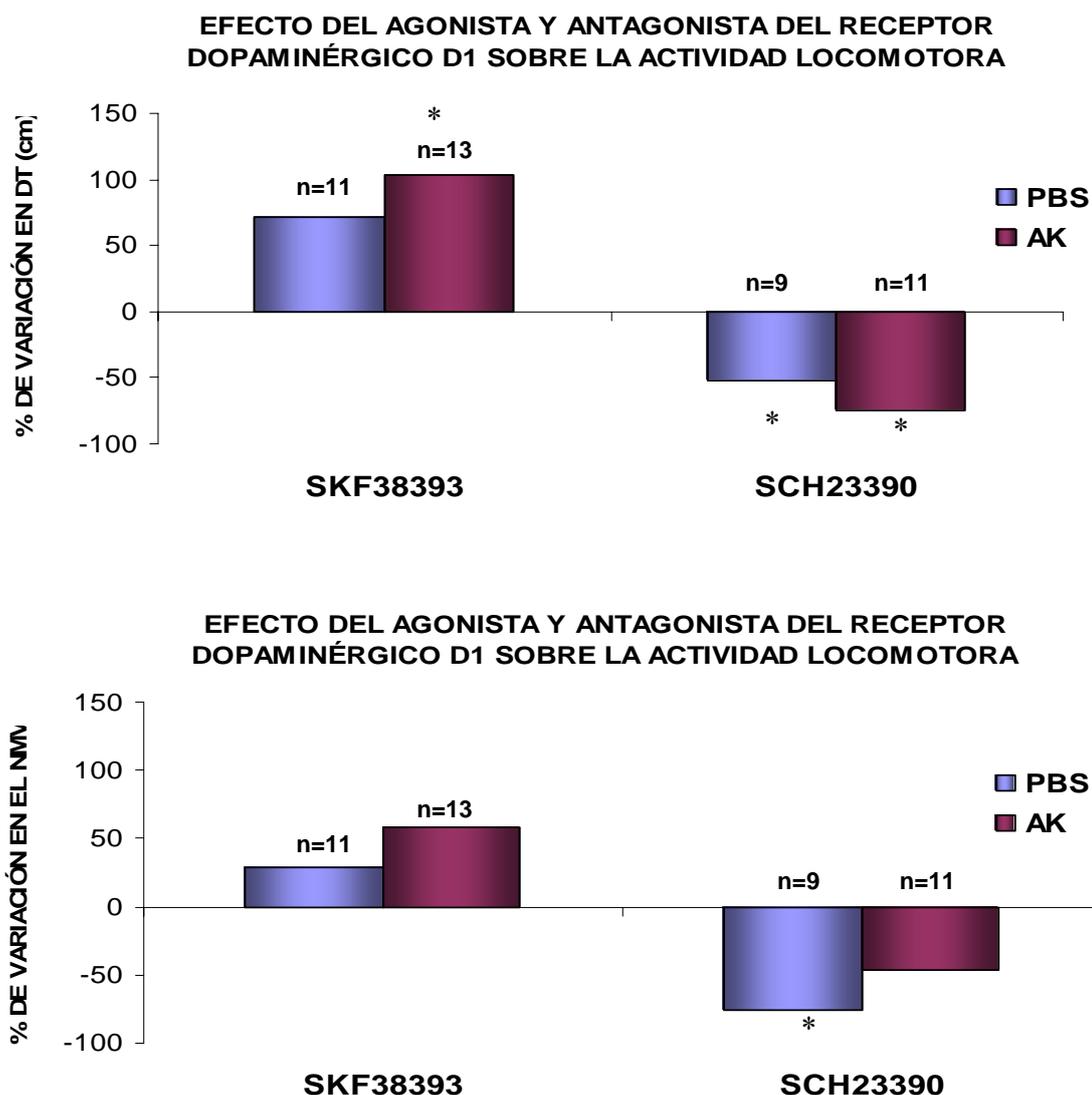


Fig. 8. Resultados de la administración de agonistas y antagonistas dopaminérgicos D1. Las figuras muestran el porcentaje de variación de DT y del NMV durante un registro de 2 horas en la fase de oscuridad. *Diferencias significativas $P < 0.05$ entre la sesión con SS vs. el fármaco en el mismo grupo.

Con respecto a la administración del agonista y antagonista dopaminérgico D2 sobre la actividad locomotora de los animales, la administración de quinpirol indujo una

disminución en su actividad. Los registros de la administración del vehículo obtenidos a los 7 días post lesión se muestran en la Tabla 5; podemos observar que los animales a los que se les administró ácido kaínico (AK) presentaron valores más elevados que los registrados por los animales controles (PBS) en ambas variables, siendo estas diferencias significativas entre los grupos [PBS vs. AK; $F(1,20)=4.66$; $P=0.043$]. Se encontraron diferencias significativas entre los fármacos administrados [SS vs. QNP, $F(1,20)=17.27$; $P<0.001$] para la DT así como también para el NMV [$F(1,20)=18.83$; $P<0.001$]. También existieron diferencias significativas entre las muestras para ambas variables [$F(7,140)=5.26$; $P<0.0001$] y [$F(7,140)=13.93$; $P<0.0001$, respectivamente], datos que se muestran en la Tabla 5.

Distancia Total (cm) DT			Núm. Mov. Verticales NMV		
	Vehículo (SS)	QNP		Vehículo (SS)	QNP
PBS (n=12)	686.70±138.10	253.14±15.52*	PBS	17.69±5.08	5.34±1.07*
AK (n=10)	1396.94±414.28	576.8±15.72*	AK	26.57±6.64	10.6±2.11*

TABLA 5. Resultados de la actividad locomotora después de la administración del agonista D2 QNP. La tabla muestra el promedio \pm EEM de DT y del NMV registrados después de la administración de SS o QNP en el estriado en animales control y lesionados. *Diferencias significativas $P<0.05$ para el registro con SS vs. el fármaco en el mismo grupo.

Por otra parte la administración del antagonista D2 evaluada a los 7 días post lesión indujo una disminución en la actividad locomotora de los animales, datos que se muestran en la Tabla 6. En los registros de la administración del vehículo los animales lesionados presentan valores más elevados que los animales del grupo control; sin embargo estas diferencias no son significativas [PBS vs. AK; $F(1,14)=0.99$; $P=0.33$]. Se encontraron diferencias significativas entre los fármacos administrados [SS vs. ETICLOP, $F(1,14)=16.63$; $P=0.001$] para DT así como también para el NMV [$F(1,14)=6.53$; $P=0.02$].

También existieron diferencias significativas entre las muestras para ambas variables (DT y NMV; $F(7,98)=3.91$; $P<0.0001$ y $F(7,98)=9.22$; $P<0.0001$, respectivamente).

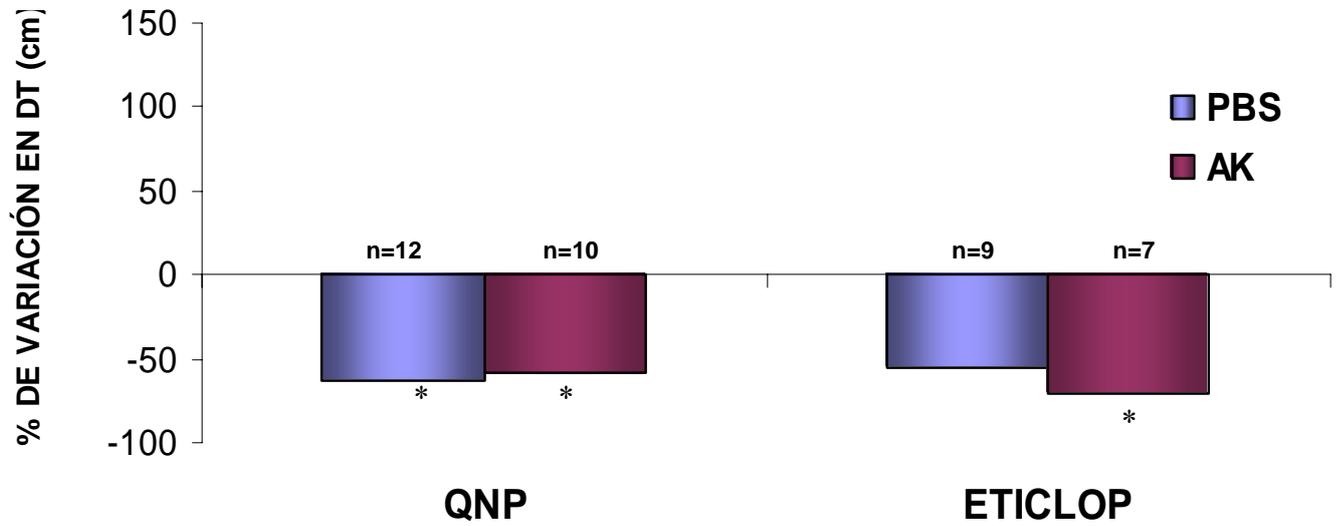
Distancia Total (cm)			Núm. Mov. Verticales		
DT			NMV		
	Vehículo (SS)	ETICLOP	NMV	Vehículo (SS)	ETICLOP
PBS (n=9)	714.95±138.10	309.76±15.52	PBS	13.40±3.14	4.15±1.01
KA (n=7)	1148.73±414.28	331.08±15.72*	KA	22.42±6.34	13.48±3.21

Tabla 6. Resultados de la actividad locomotora después de la administración del antagonista D2 ETICLOP. La tabla muestra el promedio \pm EEM de DT y del NMV registrados después de la administración de SS o ETICLOP en el estriado en animales control y lesionados. *Diferencias significativas $P < 0.05$ para el registro con SS vs. el fármaco en el mismo grupo.

En la Fig. 9 se muestra el efecto neto de los fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos D2 sobre la actividad locomotora de los animales controles (PBS) y tratados con ácido kaínico (AK); esta figura muestra el porcentaje de variación en la actividad motora en términos de la distancia total recorrida y el número de movimientos verticales que fueron evaluados durante 2 horas de registro para ambos grupos.

Podemos observar que tanto la administración del agonista como del antagonista dopaminérgico para los receptores D2, induce el mismo efecto sobre la actividad locomotora de los animales, cambio que se refleja en una disminución en los valores de la actividad locomotora en ambos grupos evaluados. Si observamos, el efecto inducido por la administración de quinpirol se ve más reducido en los animales lesionados en comparación a los animales control; por otro lado, cuando se administró el antagonista D2 eticlopride podemos observar que los animales control presentaron una disminución un poco mayor en la actividad locomotora en comparación a la mostrada por los animales lesionados.

EFFECTO DEL AGONISTA Y ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2 SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA



EFFECTO DEL AGONISTA Y ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2 SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

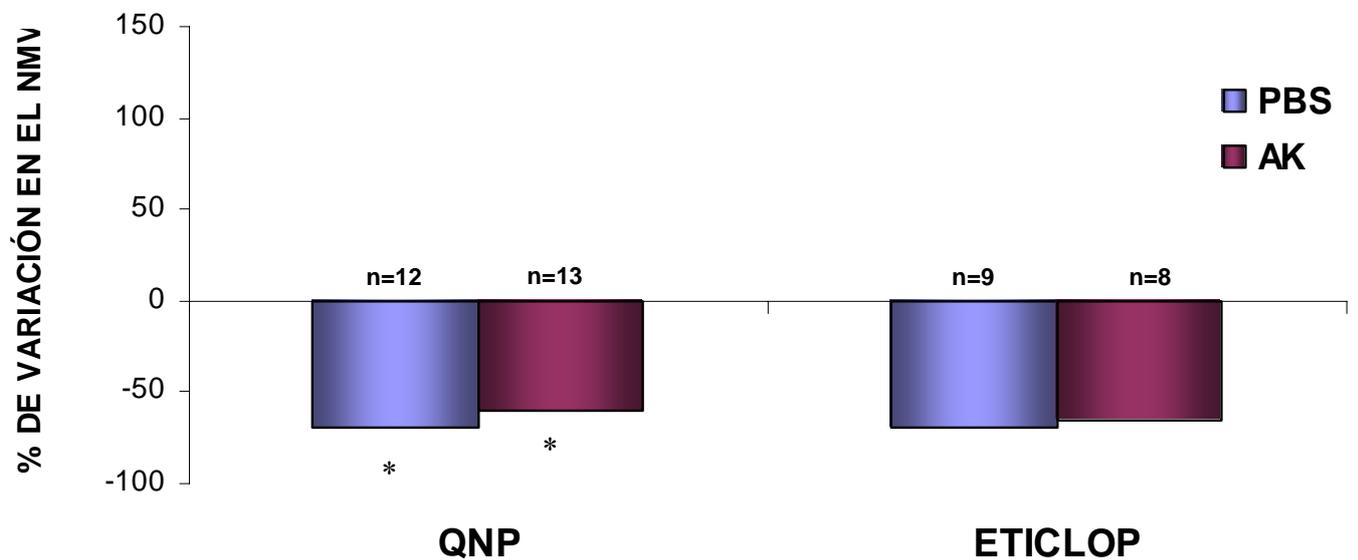


Fig. 9. Resultados de la administración de agonistas y antagonistas dopaminérgicos D2. Las figuras muestran el porcentaje de variación de DT y del NMV durante un registro de 2 horas en la fase de oscuridad. *Diferencias significativas $P < 0.05$ para la corrida con SS vs. el fármaco en el mismo grupo.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados de estos experimentos indican que la administración intraestriatal de AK induce alteraciones morfológicas en la citoarquitectura del estriado y a los 7 días post lesión se registra una hiperactividad locomotora de los animales lesionados; estos resultados coinciden con lo esperado de la generación del modelo animal de la enfermedad de Huntington (Giordano et al, 2001).

En comparación al grupo control, el incremento en la actividad de los animales lesionados fue significativo cuando fueron evaluados durante 24 horas, mientras que en registros de 2 horas las diferencias entre grupos no son significativas, pero es tiempo suficiente para observar los efectos entre los fármacos administrados.

Los resultados de los experimentos realizados en el modelo animal de la enfermedad de Huntington muestran que la administración de fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos D1 induce cambios conductuales opuestos en la actividad locomotora de los animales tanto controles como lesionados, es decir la administración del agonista induce un incremento en la actividad locomotora mientras que la administración del antagonista induce una disminución; efectos que reflejan el funcionamiento esperado de la vía directa de los ganglios basales. La administración de los fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos D2 induce el mismo efecto inhibitorio sobre la vía indirecta. Esto indica que la alteración en la actividad locomotora espontánea generada por la administración intraestriatal de AK es regulada de forma diferencial por los receptores D1 y D2.

Waszczak et al. en el 2002 describieron que la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 mediante la administración de SKF38393 causa un incremento en la actividad locomotora en ambos grupos, efecto que no fue significativo en animales controles; estos autores reportan que el incremento en la actividad locomotora sólo es significativo cuando se administra el agonista D1 (SKF38393) junto con el agonista D2 (quinpirol). Esto podría indicar un efecto sinérgico de los receptores, efecto que no se observa en animales lesionados. Los resultados obtenidos de los animales lesionados muestran un incremento en la actividad locomotora espontánea mayor a la que se

registra en animales controles, esto debido quizás a que las lesiones estriatales podrían inducir una hipersensibilidad del receptor D1, hipótesis que demostraron Bamford et al. en el 2004 en estudios realizados en animales deficientes del receptor de dopamina.

Por otra parte la administración del antagonista D1 (SCH23390) induce una disminución en la actividad locomotora en ambos grupos; efecto que no es significativo, resultado que ha sido descrito antes por diversos autores. Los efectos de los agonistas y antagonistas D1 van de acuerdo con los resultados previos descritos por Blandini et al. en el 2003 que evalúan el efecto de estos fármacos sobre la actividad cortical y estriatal por medio de la expresión de la proteína c-Fos, donde la estimulación directa de los receptores D1 causa una consistente expresión de c-Fos en el estriado inyectado; este efecto es contrarrestado por la administración sistémica del antagonista. Estos resultados indican que la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 induce la activación de la vía directa de los ganglios basales lo cual desinhibe a los núcleos del tálamo, lo que conduciría al incremento en la actividad locomotora que es la respuesta que estamos observando, mientras que la inhibición de la actividad de los receptores D1 induce una reducción de la actividad locomotora lo que refleja la inhibición de los núcleos del tálamo; esto nos indica que la respuesta locomotora se encuentra mediada por el receptor D1.

Con respecto a los efectos inducidos por la administración de agonistas y antagonistas dopaminérgicos D2, los resultados muestran que la administración intraestriatal de quinpirol tiene un efecto predominantemente inhibitorio en la actividad locomotora espontánea de ambos grupos; cambio conductual que también se observa después de la administración del antagonista D2 (eticlopride), que posiblemente esté actuando de la misma manera que el quinpirol. Contrariamente a los resultados obtenidos, mediante evaluación de c-Fos, de los efectos de fármacos D1, la estimulación de los receptores D2 a una dosis alta reduce la expresión de c-Fos en la corteza, pero si se co-administra el antagonista D2 induce expresión de c-Fos en el lado ipsilateral en el estriado pero contralateral al sitio de la inyección; de esta manera la administración sistémica de eticlopride induce preferencialmente la expresión de genes de respuesta temprana en el estriado (Blandini et al., 2003). Este resultado es consistente con el modelo de la vía indirecta de los ganglios basales en el cual la dopamina a través de los receptores D2 inhibe la actividad estriatopallidal resultando en una desinhibición de las neuronas del

GP, lo que conduce a una disminución de la actividad locomotora de los animales; resultados que confirman estudios previos realizados por Hooper et al. en 1997.

Es posible que estos resultados se deban a la localización pre y postsináptica de los receptores D2; existe evidencia que sugiere que el quinpirol podría actuar en los receptores D2 localizados presinápticamente en las terminales glutamatérgicas corticoestriatales, quizás disminuyendo la liberación de glutamato en el estriado (Flores-Hernández et al, 1997), lo que refleja la existente interacción entre dopamina y glutamato en la modulación de la actividad de las neuronas medianas espinosas (Marti et al, 2002; David et al., 2005).

Esta interacción mediada por los receptores AMPA/kainato y los receptores postsinápticos D2 podría involucrar mecanismos físicos de control que permiten la modulación facilitadora de la actividad de las neuronas estriatopalidales, lo que indica que la modulación de la liberación de dopamina en el estriado es compleja dependiendo de la localización del receptor. Otra posibilidad es que el antagonista D2 (eticlopride) esté actuando como un agonista parcial a la dosis usada (Hooper et al, 1997) o que en los animales lesionados la hipersensibilidad de los receptores D2 en axones corticales induzca un efecto postsináptico el cual sería activado por la administración del antagonista D2 (Bamford et al., 2004); sin embargo, esto último no podría describir el efecto inducido en animales sin lesión.

Para poder deducir la actividad de los receptores pre y postsinápticos D2 es necesario realizar una curva dosis-efecto de quinpirol y eticlopride con la finalidad de evaluar si los efectos inhibitorios inducidos por ambos fármacos no se deben a la dosis utilizada. Se podría evaluar también los efectos de las interacciones de los fármacos agonistas D1 y D2 con la finalidad de conocer si el efecto del quinpirol se debe al receptor D1, y si después de una administración de eticlopride (antagonista D2) el efecto permanece; esto indicará que el efecto se debe a los receptores D2. De la misma manera se podría confirmar el efecto a través de la estimulación de los receptores D1 mediante combinaciones usando agonistas D1 (SKF38393) con antagonistas D2 (quinpirol), lo que podría mostrar que los cambios conductuales observados sean atribuidos a un tipo

especifico de receptor. Cabe destacar que las neuronas medianas espinosas se encuentran controladas bajo diversos tipos de aferencias, debido a esto es importante estudiar el efecto de la interacción de los fármacos agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre otros sistemas de neurotransmisión, como por ejemplo, sistemas glutamatérgicos, adenosinérgicos, colinérgicos, etc. En futuro se requiere deducir las acciones neuronales de todos estos sustratos en sus acciones sobre la vía directa e indirecta de los ganglios basales sobre la función motora; esto permitiría crear diversas estrategias farmacéuticas para las diversas patologías en las cuales se encuentran involucrados los ganglios basales.

IX. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que la administración del agonista D1 SKF38390 induce un incremento en la actividad locomotora de los animales, mientras que la administración del antagonista D1 SCH23390 induce una disminución en la actividad locomotora siendo estos cambios conductuales semejantes en los animales lesionados y en los animales control.

Por otro lado, tanto la administración del agonista D2 quinpirol así como de su antagonista eticlopride que induce una disminución en la actividad locomotora de los animales lesionados así como también de los animales control.

Los resultados obtenidos indican que la actividad locomotora de los animales lesionados está mediada predominantemente por los receptores estriatales dopaminérgicos tipo D1, mientras que el papel de los receptores tipo D2 es todavía incierto; sin embargo cabe mencionar que con base en la literatura consideramos que la actividad conductual observada es procesada a través de los ganglios basales mediante mecanismos diferentes o a través de diferentes poblaciones neuronales que complica definir el papel de cada receptor.

X. REFERENCIAS

- Adams, A. C. & Keefe, K. A. 2000. Degree of immediate early gene induction in striatum by eticlopride determines sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Brain Res*, 885, 201-207.
- Araujo, D. A., Cherry S. R., Tatsukhawa K.J., Toyikuni T. & Kornblum H. 2000. Deficit in striatal dopamine D2 receptor and energy metabolism detected by in vivo MicroPet imaging in rat model of Huntington's disease. *Exp Neurol*, 166, 287-297.
- Bamford, N. S., Robinson, S., Palmiter, R. D., Joyce, J. A., Moore, C. & Meshul, C. K. 2004. Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J Neurosci*, 24, 9541-52.
- Bargas, J., Galarraga E. y Aceves J. 1998. Los ganglios basales. En: *Fisiología Unidad X. Células, Órganos y Sistemas* (pp. 257-272). México. D.F. Ed. Fondo de Cultura Economica.
- Blandini, F., Fancellu, R., Orzi, F., Conti, G., Greco, R., Tassorelli, C. & Nappi, G. 2003. Selective stimulation of striatal dopamine receptors of the D1- or D2-class causes opposite changes of fos expression in the rat cerebral cortex. *Eur J Neurosci*, 17, 763-70.
- Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A. & Bevan, M. D. 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat*, 196 (Pt 4), 527-42.
- Brickell, K. L., Nicholson, L. F., Waldvogel, H. J. & Faull, R. L. 1999. Chemical and anatomical changes in the striatum and substantia nigra following quinolinic acid lesions in the striatum of the rat: a detailed time course of the cellular and GABA(A) receptor changes. *J Chem Neuroanat*, 17, 75-97.
- Cattaneo, E. 2003. Dysfunction of wild-type huntingtin in Huntington disease. *News Physiol Sci*, 18, 34-7.
- Centonze, D., Gubellini, P., Usiello, A., Rossi, S., Tschertter, A., Bracci, E., Erbs, E., Tognazzi, N., Bernardi, G., Pisani, A., Calabresi, P. & Borrelli, E. 2004. Differential contribution of dopamine D2S and D2L receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum. *Neuroscience*, 129, 157-66.
- Coyle, J. T., Murphy, T. H., Puttfarcken, P. S., Lyons, E. W. & Vornov, J. J. 1991. The non-excitatory mechanisms of glutamate induced neurotoxicity. *Epilepsy Res*, 10, 41-8.
- Cruz-Aguado, R., Francis-Turner, L., Diaz, C. M. & Antunez, I. 2000. Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. *Neurochem Int*, 37, 53-60.

- David, H. N., Anseau, M. & Abraini, J. H. 2005. Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. *Brain Res Brain Res Rev*, 50, 336-60.
- Dziedzicka-Wasylewska, M. 2004. Brain dopamine receptors - research perspectives and potential sites of regulation. *Pol J Pharmacol*, 56, 659-71.
- Foster, J. A., Bezin, L., Groc, L., Christopherson, P. L. & Levine, R. A. 2003. Kainic acid lesion-induced nigral neuronal death. *J Chem Neuroanat*, 26, 65-73.
- Giordano, M. & Mejia-Viggiano, M. C. 2001. Gender differences in spontaneous and MK-801-induced activity after striatal lesions. *Brain Res Bull*, 56, 553-61.
- Graybiel, A. M. 2000. The basal ganglia. *Curr Biol*, 10, R509-11.
- Guzman, J. N., Hernandez, A., Galarraga, E., Tapia, D., Laville, A., Vergara, R., Aceves, J. &argas, J. 2003. Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci*, 23, 8931-40.
- Heimer, L., Zahm, D. & Alheid, G. 1995. Basal Ganglia. En: *The Rat Nervous System*, (pp. 579-614). USA. Ed. Academic Press.
- Hernández-Lopez, S.,argas, J., Surmeier, D. J., Reyes, A., & Galarraga, E. 1997. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J Neurosci*, 17,(9) 3334-3342
- Hooper, K. C., Banks, D. A., Stordahl, L. J., White, I. M. & Rebec, G. V. 1997. Quinpirole inhibits striatal and excites pallidal neurons in freely moving rats. *Neurosci Lett* 237, (2-3) 69-72.
- Kandel, E., Thomas, J. & James, S. 1997. El movimiento voluntario. En: *Neurociencia y conducta*, (pp. 583-589). España. Ed. Appleton & Lange.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J. & Emson, P. C. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*, 18, 527-35.
- Kiyatkin, E. A. & Rebec, G. V. 1999. Striatal neuronal activity and responsiveness to dopamine and glutamate after selective blockade of D1 and D2 dopamine receptors in freely moving rats. *J Neurosci*, 19, 3594-609.
- Lei, W., Jiao, Y., Del Mar, N. & Reiner, A. 2004. Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *J Neurosci*, 24, 8289-99.
- Levine, M. S., Cepeda C., Hickey M. A., Fleming S. M. & Chesselet M. 2004. Genetic mouse models of Huntington's and Parkinson's diseases: illuminating but imperfect. *Trends Neurosci*, 27, (11) 691-697.

- Marti, M., Mela, F., Bianchi, C., Beani, L. & Morari, M. 2002. Striatal dopamine-NMDA receptor interactions in the modulation of glutamate release in the substantia nigra pars reticulata in vivo: opposite role for D1 and D2 receptors. *J Neurochem*, 83, 635-44.
- Mena-Segovia, J., Cintra, L., Prospero-Garcia, O. & Giordano, M. 2002. Changes in sleep-waking cycle after striatal excitotoxic lesions. *Behav Brain Res*, 136, 475-81.
- Mena-Segovia, J. & Giordano, M. 2001. Los ganglios basales más allá del movimiento. En: *Temas Selectos de Neurociencias II*, (pp. 87-113). México: UNAM-PUIS. Editor Dr. Javier Velázquez Moctezuma.
- Mena-Segovia, J. & Giordano, M. 2003. Striatal dopaminergic stimulation produces c-Fos expression in the PPT and an increase in wakefulness. *Brain Res*, 986, 30-8.
- Onn, S. P., West, A. R. & Grace, A. A. 2000. Dopamine-mediated regulation of striatal neuronal and network interactions. *Trends Neurosci*, 23, S48-56.
- Parent, A. & Hazrati, L. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia.II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Rev*, (20) 128-154.
- Pérez, F. & Ríos, C. 2000. Modelos Experimentales. En: *Series del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía*, Manuel Velasco Suarez. *Enfermedad de Huntington*, (pp. 67-95). México. Ed. Publicaciones científicas.
- Qin, Z. H. & Gu, Z. L. 2004. Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington disease. *Acta Pharmacol Sin*, 25, 1243-9.
- Rhoades R.A. & Tanner, G. A. 1995. Neurofisiología. En: *Fisiología Médica*, (pp.112-123) USA. Ed. Masson-Little
- Scattoni, M. L., Valanzano, A., Popoli, P., Pezzola, A., Reggio, R. & Calamandrei, G. 2004. Progressive behavioural changes in the spatial open-field in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Behav Brain Res*, 152, 375-83.
- Sheng, M. & Greenberg, M. E. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4, 477-85.
- Smith, Y., Bevan, M. D., Shink, E. & Bolam, J. P. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, 86, 353-87.
- Steiner, H. & Kitai, S. T. 2000. Regulation of rat cortex function by D1 dopamine receptors in the striatum. *J Neurosci*, 20 (14) 5449-60.
- Tarazi, F. I., Campbell, A. & Baldessarini, R. J. 1998. Effects of hippocampal kainic acid lesions on striatolimbic dopamine D1-, D2-, and D4-like receptors. *Neuroscience*, 87, 1-4.

- Tepper, J. M. & Bolam, J. P. 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 685-92.
- Timmerman, W., Westerhof, F., van der Wal, T. I. & Westerink, B. H. 1998. Striatal dopamine-glutamate interactions reflected in substantia nigra reticulata firing. *Neuroreport*, 9, 3829-36.
- Walters, J. R., Ruskin, D. N., Allers, K. A. & Bergstrom, D. A. 2000. Pre- and postsynaptic aspects of dopamine-mediated transmission. *Trends Neurosci*, 23, S41-7.
- Waszczak, B. L., Martin, L., Boucher, N., Zahr, N., Sikes, R. W. & Stellar, J. R. 2001. Electrophysiological and behavioral output of the rat basal ganglia after intrastriatal infusion of d-amphetamine: lack of support for the basal ganglia model. *Brain Res*, 920, 170-82.
- Waszczak, B. L., Martin, L. P., Finlay, H. E., Zahr, N. & Stellar, J. R. 2002. Effects of individual and concurrent stimulation of striatal D1 and D2 dopamine receptors on electrophysiological and behavioral output from rat basal ganglia. *J Pharmacol Exp Ther* 300, (3) 850-61.
- Waxman, S. 2001. Ganglios Basales. En: *Neuroanatomía correlativa*, (pp. 461). México. Ed. Manual Moderno.

XIII. ANEXOS

ANEXO I

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PRE Y POST LESIÓN DE DIAZEPAM A DIFERENTES DOSIS EN ANIMALES LESIONADOS POR ÁCIDO KAÍNICO EN EL ESTRIADO.

OBJETIVO

Demostrar que la administración pre y post de diazepam a diferentes dosis en animales lesionados con ácido kaínico en el estriado, modifica la actividad inducida por el ácido kaínico en estos animales.

HIPÓTESIS

- El pre y post tratamiento con diazepam genera una protección contra los efectos del ácido kaínico sobre el estriado.
- El efecto protector del diazepam es dependiente de la dosis.

INTRODUCCIÓN

La administración de diazepam previene los efectos neurotóxicos y convulsivantes generados por la administración intracerebral de ácido kaínico (De Bonnel & De Montigny, 1983; Imperato, Porceddu, Morelli, Fossarello & Di Chiara, 1981), este es un neurotóxico que produce muerte celular por excitotoxicidad y liberación de deshidrogenasa láctica, proceso que al parecer depende del calcio extracelular (Coyle, Murphy, Puttfarcken, Lyons & Vornov, 1991). Di Chiara et al. (1981) demostraron que al administrar intracerebralmente ácido kaínico en el ventrículo lateral, la amígdala o el estriado se induce muerte celular en el hipocampo y en el núcleo talámico medial; sin embargo la administración sistémica previa de diazepam evita este daño.

Otra estructura que sufre severos daños por las administraciones intracerebrales de ácido kaínico es el estriado; este tipo de lesión excitotóxica resulta en un incremento de la actividad locomotora

espontánea de los animales (Giordano & Mejia-Viggiano, 2001); además de inducir cambios bioquímicos e histológicos semejantes a los observados en pacientes con la enfermedad de Huntington (Coyle , Molliver & Kuhar, 1978), siendo un buen modelo para el estudio de esta enfermedad, cuyo protocolo incluye la administración de diazepam con la finalidad de proteger al hipocampo de daños inducidos por ácido kaínico y localizar la lesión en el estriado, lo que nos permite evaluar las alteraciones conductuales debidas al daño en el estriado. Sin embargo, hasta el momento ningún estudio ha evaluado si la dosis de diazepam o la misma dosis empleada para proteger al hipocampo podría inducir una neuroprotección en el cuerpo estriado. Debido a esto el objetivo de este trabajo fue determinar si la administración pre y post a la lesión intraestriatal de diazepam, evita las secuelas conductuales e histopatológicas inducidas por la administración de ácido kaínico; para observar este efecto se evaluó la actividad locomotora y exploratoria de los animales utilizando un sistema automatizado (Digiscan animal activity system, AccuScan electronics, Columbus OH) y las variables analizadas fueron: distancia total recorrida y número de movimientos.

METODOLOGÍA

Sujetos: Ratas macho Sprague-Dawley (250-300g), que se mantuvieron bajo ciclo invertido luz/oscuridad 12:12 (LD12:12), con libre acceso a la comida y al agua. Implantación de cánulas: Los animales fueron anestesiados inyectando vía intraperitoneal (i.p.) 1 ml/kg de peso de una mezcla de Ketamina (70 mg/kg) y Xilazina (6 mg/kg). El animal se colocó en el aparato estereotáxico y se realizaron dos trépanos en las coordenadas 1.2 mm antero posterior con respecto a Bregma y ± 2.6 mm medio lateral respecto a la línea media.

Para lesionar a los animales se utilizó un inyector de 10 mm de largo, el cual descendió a 4.5 mm a partir de la duramadre y se les administró un amortiguador de fosfatos (PBS) o ácido kaínico (AK) a una dosis de 5 nmoles unilateral intraestriatalmente y 20 minutos después se les inyectó el lado contralateral de la misma manera. Se les administró a 9 animales PBS y a 25 se les administró AK. El volumen administrado de cada sustancia fue 0.5 μ l a una velocidad de infusión de 0.1 μ l/min durante 5 minutos dejando los inyectores 2 minutos más para permitir su difusión. Durante este procedimiento a los animales se les administró 1 ml/kg de peso de diazepam o vehículo (SS) dividido en dos partes iguales; se administró una parte antes de la inyección del PBS o del ácido kaínico y el resto después de la inyección del lado contralateral con PBS o ácido kaínico.

La dosis de diazepam administrada así como también el número de animales en cada grupo se muestra en la Tabla 1.

PBS (25)	(4) D- 5 mg/kg pp
	(7) SS
	(14) D- 5 mg/kg post
AK (36)	(6) D- 5 mg/kg pp
	(6) D- 2 mg/kg. pp
	(8) D- 0.5 mg/kg pp
	(16) D- 5 mg/kg post

TABLA 1. Tabla de tratamientos de diazepam (D). Dosis administradas pre y post lesión (pp) así como aquellas administradas post lesión (post) para los animales control (PBS) y experimentales (AK).

Finalmente a todos los animales se les inyectó vía intramuscular 0.5 ml de Penicilina (300,000 UI) y se dejaron en recuperación; durante este tiempo se vigiló el peso de los animales y se les administró vía subcutánea 3 ml de Ringer-Lactato durante 3 días. Al cuarto día post lesión, los animales se colocaron en las cajas de actividad locomotora en tres sesiones de 20 minutos en días no consecutivos, para su adaptación al lugar donde se desarrollaron los experimentos.

Posteriormente se iniciaron los registros de la actividad locomotora de los animales, la cual fue registrada usando un sistema Digiscan (Digiscan animal activity system, AccuScan electronics, Columbus OH) y las variables a analizar son: distancia total y número de movimientos. Estos registros se realizaron a los 7 y 30 días post lesión durante 25 horas, en un horario de 9:00 AM a 10:00 AM.

Al término del experimento los animales fueron perfundidos intracardialmente con paraformaldehído al 4% (en solución de fosfatos 0.1 M a pH 7.4); los cerebros se conservaron en sacarosa al 30% hasta el momento en que fueron cortados en el microtomo a 50 μ m para posteriormente ser teñidos con violeta de cresilo y con citocromo oxidasa para verificar el sitio de la lesión, la ubicación de las cánulas en el estriado así como también su citoarquitectura.

Análisis de datos: Los resultados fueron analizados mediante pruebas paramétricas utilizando una prueba de varianza factorial (ANDEVA) y seguido por comparaciones pre-planeadas entre los grupos de interés, siendo el valor de significancia para la prueba de $P < 0.05$. Los resultados

presentados se reportan en promedios de las 12 muestras tomadas por el Digiscan en el ciclo de oscuridad; además se muestra el error estándar de la media (EEM) como medida de variabilidad en las muestras.

Resultados

A los 7 días post lesión se registró la actividad locomotora de todos los animales durante registros de 25 horas, con la finalidad de evaluar su actividad durante el ciclo de luz y oscuridad. Los resultados muestran que los animales que recibieron una inyección intraestriatal de ácido kaínico presentan valores mayores en la actividad locomotora que aquellos que recibieron PBS durante el ciclo de oscuridad, siendo esta diferencia significativa [$F(1,58) = 7.77$; $P=0.007$] y en el ciclo de luz ambos grupos se comportan de forma similar (Fig. 1).

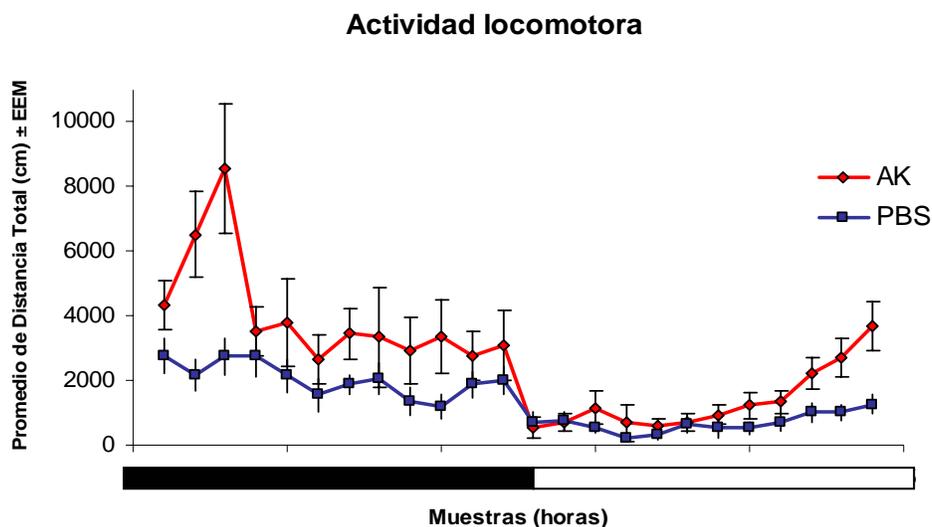


Fig. 1. Actividad locomotora espontánea registrada a los 7 días post lesión durante 24 horas en un ciclo luz/oscuridad en animales control (PBS) y lesionados con ácido kaínico (AK). La barra negra significa el periodo de oscuridad (12 hrs.) y la barra blanca el periodo de luz (12 hrs).

Posteriormente se analizó cada una de las dosis de diazepam aplicadas a cada uno de los grupos. En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos para las variables de distancia total y número de movimientos a los 7 y 30 días post lesión tratados con diferentes dosis de diazepam administrado pre y post lesión (pp).

Los animales tratados con PBS que recibieron diazepam 5 mg/Kg (pp) y el que recibió solución salina (SS), no presentan diferencias significativas entre ellos [$F(1,8) = 0.26$; $P=0.62$], por lo tanto se agruparon ambos grupos y se manejó como un grupo control para las posteriores comparaciones con cada uno de los grupos tratados con AK. En la Tabla 2 se muestran las medias \pm EEM de estos grupos.

GRUPOS		Registro a los 7 días post lesión		Registro a los 30 días post lesión	
		Distancia Total	Núm. de Mov.	Distancia Total	Núm. de Mov.
PBS	D-5 mg/kg pp	1580.9 \pm 1080.6	140.6 \pm 1.73	4107.02 \pm 1456.5	253.04 \pm 77.0
	SS	2402.09 \pm 1160.9	195.7 \pm 2.23	2935.4 \pm 896.4	151.66 \pm 42.01
AK	D-5 mg/kg pp	6322 \pm 2697.2	280.86 \pm 86.6	5827.8 \pm 2122.7	306.9 \pm 71.61
	D-2 mg/kg pp	6054.3 \pm 3033.5	232.21 \pm 77.2	4101.08 \pm 1383.9	274.8 \pm 63.7
	D-0.5 mg/kg pp	7875.93 \pm 4015.0	223.37 \pm 59.0	4307.38 \pm 1479.8	230.08 \pm 59.65

Tabla 2. Tabla de resultados de los registros de actividad locomotora a los 7 y 30 días post lesión. Se muestra el promedio de la distancia total y número de movimientos \pm EEM registrada durante el ciclo de oscuridad en animales control y lesionados que recibieron diazepam en varias dosis. Abreviaturas: pp; pre y post lesión.

En el grupo tratado con AK, los animales presentan diferencias significativas con respecto al grupo control. Cuando se compara el grupo control con el grupo kaínico que recibió una dosis de diazepam de 5 mg/kg, presenta diferencias significativas para la variable distancia total [Control vs AK (D-5mg/kg pp), $F(1,12) = 5.81$; $P=0.02$], así como también en el número de movimientos [$F(1,12) = 6.29$; $P=0.02$] en el registro de 7 días post lesión; sin embargo al registrar a los animales a los 30 días post lesión no se encuentran diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas.

El segundo grupo tratado con diazepam recibió una dosis de 2 mg/kg; cuando se comparó el grupo lesionado con el control, nuevamente encontramos diferencias significativas para ambas variables analizadas, en distancia total [Control vs AK(D-2mg/kg pp), $F(1,13) = 21.66$; $P<0.01$] y en número de movimientos [$F(1,13) = 8.68$; $P=0.0011$]; nuevamente al evaluar este grupo a los 30 días post lesión no encontramos diferencias significativas para ninguna de las variables.

Finalmente el tercer grupo se trató con una dosis de diazepam de 0.5 mg/Kg; cuando se comparó con el grupo control, encontramos diferencias significativas para ambas variables [Control vs AK (D-0.5 mg/Kg pp), $F(1,12) = 8.55$; $P=0.012$] y [$F(1,12) = 8.07$; $P=0.007$] en el registro de 7 días post lesión, desapareciendo esta diferencia significativa en el registro de 30 días post lesión para ambas variables.

En la Figura 2 se muestran los valores de las medias de cada uno de los grupos evaluados, en distancia total y número de movimientos a los 7 y 30 días post lesión.

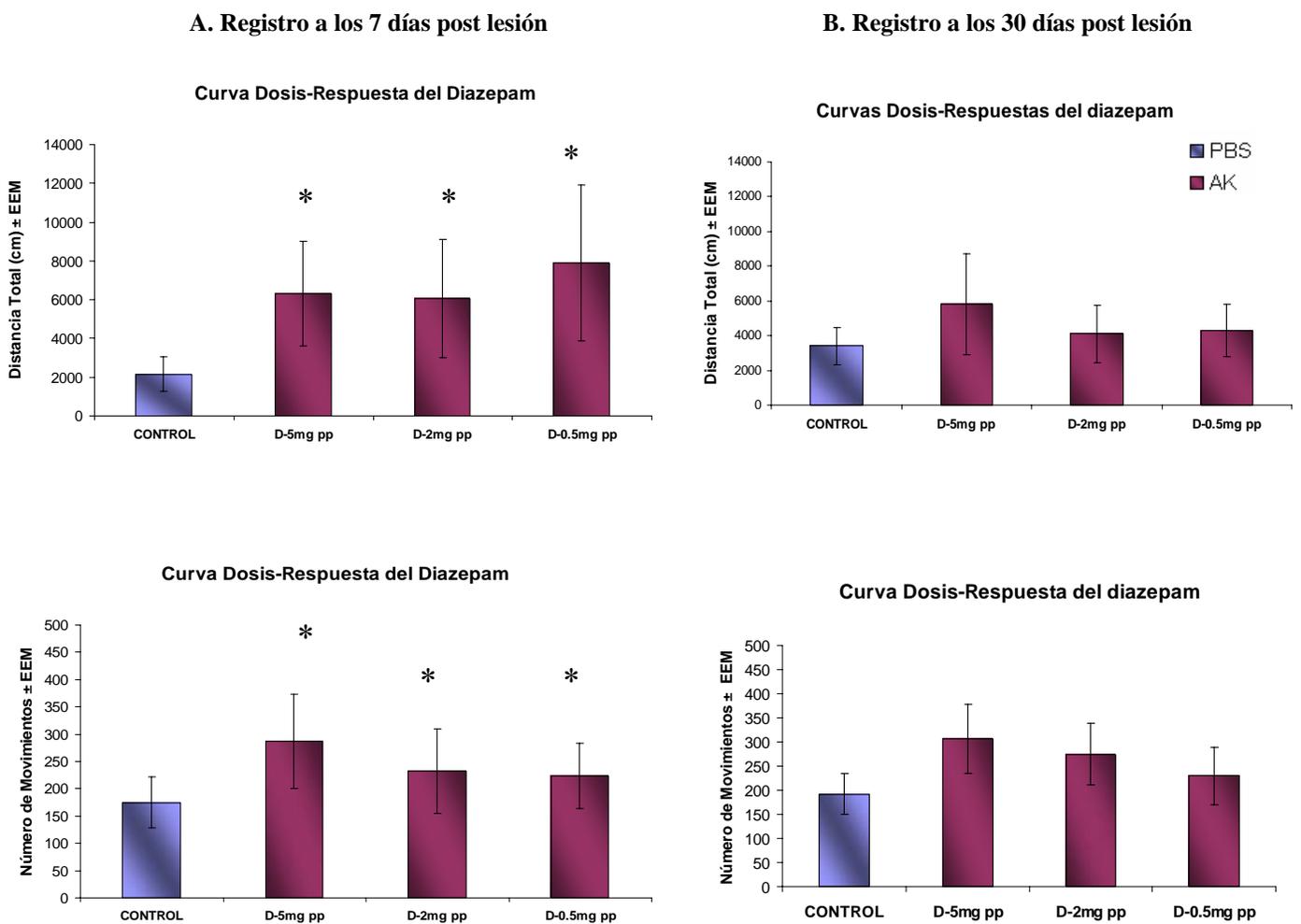


Fig. 2. Actividad locomotora. Promedios de distancia total y número de movimientos durante 12 horas en el ciclo de oscuridad. (A) Registro a los 7 días post lesión, (B) Registro a los 30 días post lesión. *Comparaciones pre-planeadas entre grupos fueron realizadas después del ANDEVA para las diferentes dosis de diazepam administradas, valor de significancia $P<0.05$. Abreviaturas: pp: tratamiento pre y post lesión.

Posteriormente se trató a un grupo de ratas que solamente recibieron diazepam post lesión y se registró su actividad locomotora a los 7 y 30 días. Los animales que recibieron una inyección intraestriatal de AK muestran un incremento en la actividad locomotora en comparación al grupo control; esta diferencia es significativa en distancia total [PBS vs. AK 7 días post lesión; $P=0.034$] y en el número de movimientos ($P=0.029$) a los 7 días post lesión. Posteriormente los animales fueron evaluados nuevamente a los 30 días post lesión y encontramos que en ninguna de las dos variables existen diferencias significativas (Tabla 3).

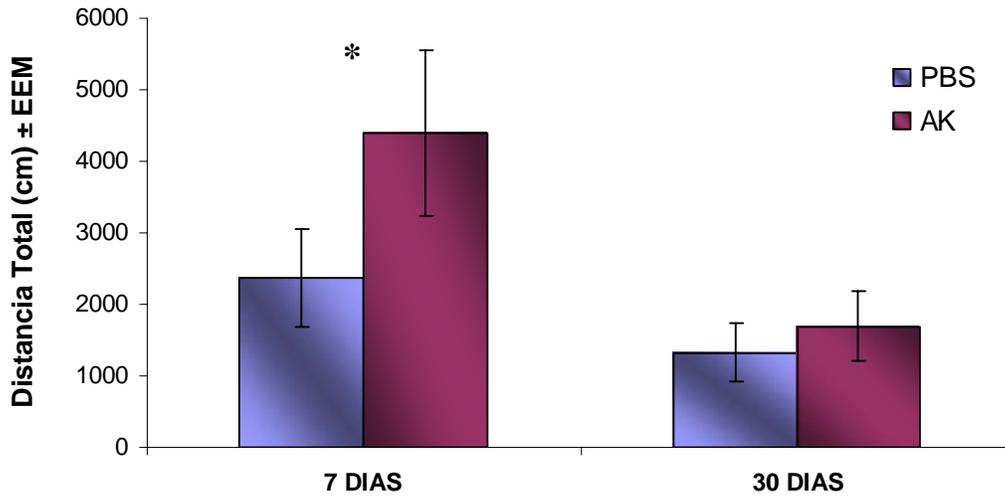
GRUPOS	Registro a los 7 días post lesión		Registro a los 30 días post lesión	
	Distancia Total	Núm. de Mov.	Distancia Total	Núm. de Mov.
PBS	2369.3 ± 695.5	158.7 ± 407.9	1319.2 ± 28.7	138.2 ± 32.1
AK	4385.8 ± 1157.4	206.9 ± 487.5	1688.7 ± 34.4	143.8 ± 28.3

Tabla 3. Tabla de resultados de los registros de actividad locomotora a los 7 y 30 días post lesión. Se muestra el promedio de la distancia total y número de movimientos ± EEM registrada durante el ciclo de oscuridad en animales control y lesionados que recibieron una dosis de diazepam de 5 mg/kg después de la lesión.

También analizamos las diferencias dentro de los grupos a lo largo del tiempo, cuando comparamos dentro del grupo PBS el promedio de la actividad locomotora en distancia total a los 7 días y 30 días, encontramos que no existen diferencias significativas (PBS 7 días vs. PBS 30 días; $P=0.20$), así como tampoco existen diferencias significativas en el número de movimientos ($P=0.34$); por otro lado cuando comparamos dentro del grupo AK encontramos diferencias significativas entre los registros a los 7 y 30 días post lesión en ambas variables (AK 7 días vs. AK 30 días; $P=0.002$ y $P<0.01$ respectivamente).

En la Figura 3 se muestran los promedios de los grupos a los 7 y 30 días post lesión que fueron evaluados durante el ciclo de oscuridad.

Actividad Locomotora registrada durante el ciclo de oscuridad.



Actividad Locomotora registrada durante el ciclo de oscuridad

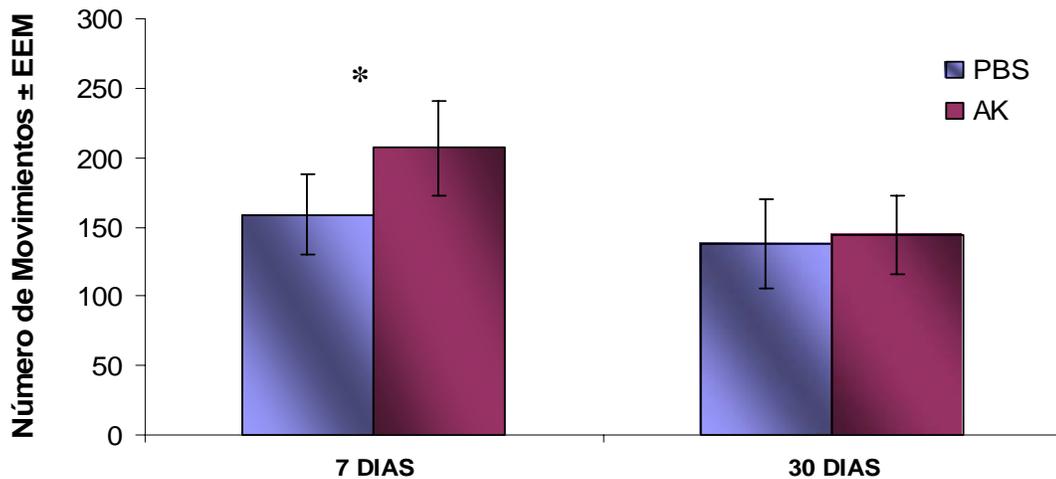


Fig. 3. Actividad locomotora. Promedios de distancia total y número de movimientos durante 12 horas en el ciclo de oscuridad. * Comparaciones Control vs. AK a los 7 y 30 días post, valor de significancia $P < 0.05$

Finalmente evaluamos los promedios de los grupos tratados con diazepam pp contra los tratados con diazepam post en el registro a los 7 días post lesión, debido a que en este tiempo encontramos diferencias significativas entre los grupos. Cuando comparamos los grupos PBS, no existen diferencias significativas en ninguna de las variables y tampoco existen diferencias significativas entre los grupos con AK en ninguna de las variables (Datos no mostrados).