



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO.

Facultad de Estudios Superiores
Iztacala

**Efecto de la L-Dopa y de la Melatonina en la
conducta motora de ratas lesionadas con 6 –
OHDA: Modelo de la enfermedad de Parkinson**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

LIC. EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A

FIDENCIO MAYORAL JOSÉ



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

2008



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.

DEDICATORIAS

Dedicada especialmente a mi tía Dominga, quien siempre me alentó a alcanzar mis objetivos cada vez que mire al cielo y vea una estrella brillante sabré que ahí estarás para escucharme.

A mi madre por todo el apoyo desmedido desde el principio de mi vida, por las palabras de aliento para siempre tener la frente en alto, por los buenos momentos de mi vida a su lado.

A mis hermanos.

Dedicada especialmente a mi hermana Ofe, por tu apoyo y atención, piedra angular en mi vida y en carrera.

A mi hermana Ana por extenderme tu mano siempre, para apoyarme y no dejarme caer. Por todo el apoyo moral para alcanzar los objetivos e ir por otro.

Muy especialmente a ti Maria Rosa, por permitirme ser un miembro más de esta tripulación, por todo el apoyo incondicional que me has brindado y por no dejarme naufragar. Jamás dejare de estar agradecido con la vida por haberme puesto ante ti.

A Jesús, Paty, Laura, Maria Rosa, Ana Luisa, Luís, Luisa, Luis Clemente, Vero, Erick, Enrique, Lichita, etc. Mis compañeros y amigos de laboratorio, por que juntos con ellos aprendí y he vivido grandes momentos.

A Iván, Vero, Burruhus, Ana, Luisa, Luís, Lupita, Yessi. Mis mejores amigos, quienes siempre han estado ahí para escucharme y apoyarme y ser cómplices de este logro.

Para ti Alex por permitirme ser parte de tu vida e historia. Gracias por el gran amor y apoyo que todos los días me brindas.

A Verónica Anaya por la paciencia y el tiempo para la realización de este trabajo, cuyo aporte ha sido esencial. Gracias Vero.

Agradecer de forma especial a la Dra. María Rosa, Dra. Laura Colin B y a la Dra. Verónica Anaya por el apoyo para la realización de este estudio.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Enfermedad de Parkinson	2
Tratamientos	13
JUSTIFICACIÓN	19
Objetivo general	19
Objetivo particular	20
METODO	21
Adiestramiento	21
Prueba de campo abierto	22
Prueba de la escalera	23
Lesión	25
RESULTADOS:	28
Prueba de la viga	28
Prueba de campo abierto	31
Cruzar las líneas	31
Acicalarse	32
Erguirse	32
Tiempo de no movimiento	33
Prueba de la escalera	36
Aciertos	
Miembro Contralateral	36
Miembro Ipsilateral	37
Intentos	
Miembro Contralateral	39
Miembro Ipsilateral	40
DISCUSIÓN	43
Desempeño del grupo lesión	44
Desempeño del grupo tratado con L-Dopa	45
Desempeño del grupo tratado con Melatonina	47
CONCLUSIONES	51
Anexo	52
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas (DA) de la sustancia negra compacta (SNc), junto a una significativa disminución del contenido de dopamina en el estriado, representan las alteraciones histológicas y neuroquímicas más importantes de esta enfermedad. Para el estudio de dicha enfermedad se han desarrollado diversos modelos experimentales, entre ellos se encuentra el modelo de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) que destruye selectivamente las neuronas dopaminérgicas de la SNc, lo cual provoca una disminución en los niveles de dopamina en el estriado, derivando en las alteraciones motoras que caracteriza a la EP. El fármaco más utilizado para el tratamiento de esta enfermedad es la L-Dopa la cual parece tener efectos secundarios después de un periodo prolongado de administración, ya que se ha reportado que es capaz de generar radicales libres derivados de su metabolismo. Por otra parte la melatonina, es un producto de secreción de la glándula pineal, y se le han atribuido propiedades antioxidantes. Por lo cual nuestro objetivo fue el de comparar el efecto de la L-DOPA y la Melatonina sobre la conducta motora fina de ratas hembras después de la lesión unilateral con 6-OHDA. Todos los animales fueron entrenados en la viga de equilibrio y se tomó una evaluación control antes de la lesión con 6-OHDA. Se utilizaron 15 ratas hembras, 10 se lesionaron con 8 μg de 6-OHDA. A las 48 horas se evaluó la conducta de giro con apomorfina (0.25 mg/Kg. i.p), y solo se utilizaron aquellos animales que presentaron 200 giros o más en 30min. 5 ratas fueron tratadas oralmente con 10 mg/Kg de melatonina durante 28 días, 5 ratas fueron tratadas oralmente con 15mg/kg de L-Dopa durante 28 días y 5 ratas lesionadas sin tratamiento fueron mantenidas durante el mismo tiempo. La evaluación de la conducta motora fue a los 7, 14, 21 y 28 días después de la lesión. En nuestros resultados se pudo observar que el grupo que no recibió tratamiento tuvo dificultades para ejecutar la prueba motora, el grupo tratado con L-dopa mostró cierta mejoría en la ejecución de la prueba motora al los 7 y 14 días, no así a los 21 y 28 días de evaluación, donde se observó una clara dificultad para ejecutar esta prueba. El grupo tratado con melatonina tuvo una mejor ejecución en la prueba de la viga, haciéndose notar en comparación al grupo tratado con 6-OHDA a los 21 y 28 días de evaluación. Con lo anterior podemos decir que la mejoría de los animales tratados con melatonina probablemente se deba a su acción antioxidante y a la capacidad de inhibir los fenómenos excitotóxicos, más aún, la melatonina actúa como un protector celular, ya que degrada de forma directa los radicales libres, pudiéndose considerar como una opción en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

INTRODUCCIÓN

La muerte celular fue reconocida por primera vez como una característica regular en el desarrollo de los vertebrados hace aproximadamente 70 años. En las dos últimas décadas se ha enfatizado el estudio de los mecanismos de neurodegeneración y muerte celular como un punto crucial para comprender los eventos celulares que caracterizan a varias enfermedades y al envejecimiento (Pavón, 1998).

Las Enfermedades Neurodegenerativas (EN) son procesos crónicos y progresivos, y están caracterizados por la pérdida selectiva y simétrica de neuronas en los sistemas motor, sensorial y cognitivo. La delimitación de los patrones de pérdida celular y la identificación de marcadores celulares específicos de las EN han ayudado a la clasificación nosológica de estas enfermedades en la siguiente forma:

Enfermedad de Alzheimer: es una demencia degenerativa primaria de origen desconocido que se inicia de manera gradual y progresa con lentitud (Grau-Veciana, 2006). Se caracteriza por un deterioro intelectual y progresivo que involucra procesos cognitivos superiores como la pérdida de las funciones de la memoria, la capacidad de atención y de concentración, así como del lenguaje y razonamiento (Jiménez del Río, 2001).

Esclerosis lateral amiotrófica: considerada una afección progresiva degenerativa de las neuronas motoras de la corteza cerebral y la más devastadora de todas las enfermedades conocidas de índole neurodegenerativo. Afecta la vía piramidal con disminución de las neuronas del asta anterior de la medula espinal y de los núcleos motores de los pares craneanos inferiores. El resultado es un cuadro clínico caracterizado por la afección simultánea del axón de la neurona motora central y periférica (González, 2004).

Enfermedad de Huntington (EH): Esta degeneración provoca movimientos incontrolados, pérdida de las facultades intelectuales y problemas emocionales. La EH no solo afecta a las neuronas del núcleo caudado y pálido, también afecta otras partes del cerebro, como la corteza, que controla el pensamiento y la memoria. Los primeros síntomas pueden incluir dificultad para aprender cosas nuevas, recordar hechos, responder a preguntas o tomar decisiones. Algunos pacientes incluso pueden tener cambios en la escritura. Cuando la enfermedad progresa, la concentración para desarrollar funciones intelectuales se convierte en una gran dificultad. En algunas personas la enfermedad puede comenzar con movimientos incontrolados, en los dedos, pies, cara o tronco. Estos movimientos son signos de corea, a menudo se intensifica cuando la persona está ansiosa. La EH puede también comenzar con torpeza o problemas con el equilibrio. Otras personas desarrollan movimientos coreicos posteriormente cuando la enfermedad progresa (Asociación Española de Corea de Huntington, 2002).

La Enfermedad de Parkinson: se caracteriza por la presencia de acinesia, que comprende la bradicinesia (lentitud) e hipocinesia (pobreza de movimientos), que a su vez se asocia con rigidez y con temblor (Litvan, 1999).

La herencia mendeliana puede ser demostrada en la mayoría de las EN. En algunas de ellas, como ocurre en la EH, puede ser detectada una historia familiar, mientras que en otras, como la Enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, solo del 1 al 10 % de los casos son hereditarios, con frecuencia de carácter autonómico (Arpa, 2004).

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita originalmente en 1817 por James Parkinson, un médico británico que publicó un artículo sobre lo que él llamó "*La Parálisis Agitante*", en la que se manifestaban síntomas como movimientos involuntarios, temblor en las manos, los brazos, las piernas, la mandíbula y la cara; la rigidez de las extremidades y el tronco; la bradicinesia o lentitud de movimiento; y la inestabilidad de postura o la coordinación o balance afectados. A medida que estos síntomas se hacen más pronunciados, los pacientes pueden tener dificultad al caminar, hablar y realizar otras tareas simples (Alanis, 1996; Larumbe, 1999). La rigidez es causada por el aumento del tono muscular que afecta a todos los grupos musculares (flexores, extensores, músculos axiales o de extremidades) y se refiere a la resistencia que presentan algunas partes del cuerpo al movimiento (el miembro del cuerpo no funciona a pesar de que el sujeto desea que se mueva). La rigidez suele ser asimétrica a lo largo de la evolución de la enfermedad, aunque en estadios avanzados es casi siempre bilateral (García-

Martínez, 2003). La acinesia se manifiesta como dificultad para iniciar y efectuar movimientos secuenciales voluntarios del tipo más común, incluyendo ponerse de pie, caminar, comer, escribir, entre otros. Las líneas de la cara del paciente son lisas, su expresión es fija, y casi no hay prueba manifiesta de respuesta emocional espontánea. También se presenta alteración de los reflejos posturales: postura encorvada del tronco, con la cabeza y los hombros caídos; así como enlentecimiento de la marcha, los pasos son cortos y arrastrando los pies, los brazos se mantienen a los lados y no se balancean rítmica ni automáticamente con las piernas. Aunque el paciente tiene dificultad para dar los primeros pasos, una vez iniciada la marcha, los pasos son cada vez más rápidos y tiene dificultad para detenerse cuando ha alcanzado su meta, a esta anomalía para caminar se le llama marcha festinante (Gilman, 1994).

Otros síntomas acompañan a la EP; algunos son menores, otros más preocupantes. Muchos pueden tratarse con medicamento apropiado o con terapia física. Nadie puede pronosticar qué síntomas afectarán a un paciente individual y la intensidad de los síntomas también varía de una persona a otra. Ninguno de estos síntomas es mortal, aunque, en algunas ocasiones el paciente puede presentar problemas de deglución (Parkinson's Institute, 2003).

Se sabe que para que los signos clínicos se hagan evidentes se requiere una pérdida superior al 80% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Costa, 2001; Tapia-Nuñez, 2004). La EP se caracteriza por un deterioro crónico y progresivo de las neuronas dopaminérgicas de la zona compacta de la sustancia negra, con destrucción resultante de la vía nigroestriatal, siendo la pérdida dopaminérgica del estriado la responsable de las principales alteraciones motoras (González-Fraguela, 1999; Radad, 2005).

En 1962, Hornykiewicz determinó que los pacientes con EP presentaban degeneración en las neuronas en la sustancia negra compacta (SNc), un núcleo del mesencéfalo que recibe su nombre porque la presencia de melanina da a las

células un color oscuro. Los estudios de Hornykiewicz pusieron de manifiesto que en la EP los niveles de Dopamina (DA) se encuentran seriamente disminuidos en uno de los principales blancos de la SNc: el estriado. De esta manera se asoció a la DA con la expresión de la actividad motora, y se originó una serie de investigaciones destinadas a conocer las causas por las que la disminución de las concentraciones de este neurotransmisor puede provocar enfermedades incapacitantes (Zigmond *et al.*, 1990).

En 1966 Hornykiewicz analizó cerebros de pacientes parkinsonianos y encontró reducción significativa de la DA, serotonina y norepinefrina en la sustancia nigra y en consecuencia en el cuerpo estriado; también observó, que de las tres aminas biogénicas, la que más drásticamente estaba reducida era la DA. Además de la reducción de DA, los cerebros de los parkinsonianos mostraban pérdida de las células nerviosas y despigmentación de dos núcleos del tallo cerebral: la sustancia nigra y el locus coeruleus (Zigmond *et al.*, 1990).

Recientemente se ha encontrado que los ganglios basales (un grupo de núcleos cerebrales) envían información a múltiples regiones de la corteza frontal, incluyendo áreas que suelen considerarse cognitivas. Esto ha permitido que se especule sobre el papel integrador de los ganglios basales pudiera tener sobre el control de los movimientos voluntarios. Se ha postulado que estos núcleos contribuyen a la iniciación-ejecución de los movimientos, en la secuencia motora, en la realización automática de movimientos rutinarios, en la inhibición de programas motores antagónicos, en el aprendizaje motor y en mecanismos de recompensa (Schultz, 1998).

Las enfermedades que afectan a los ganglios basales producen principalmente movimientos involuntarios. Estos son: temblor (con movimientos involuntarios rítmicos y oscilatorios), atetosis (movimientos lentos de los dedos, manos y en ocasiones de los pies), corea (movimientos abruptos de los miembros y de los músculos de la cara), balismo (movimientos violentos) y distonia (postura

persistente de alguna parte del cuerpo que puede resultar en movimientos grotescos y posturas distorsionadas del cuerpo -Velasco, 1986; Joyce, 1993).

Su etiología es desconocida y probablemente multifactorial, pueden estar implicados factores genéticos, ambientales, daño oxidativo y envejecimiento cerebral acelerado o apoptosis. Respecto a su distribución se calcula que en España tiene una prevalencia del 1 %, la edad promedio en que inician los síntomas está en torno a los 55 años. En México se calcula que afecta al 1-2 % de las personas mayores de 65 años. Por lo que según cifras de El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, se indica que existen alrededor de 140,000 personas con esta enfermedad (Ramírez,(2007).

La EP puede afectar a toda la población sin importar su edad, contrariamente a lo que se cree, no se trata de una patología exclusiva de las personas mayores, aunque es cierto que la mayoría de los enfermos superan los 60 años. Cuando la EP se inicia antes de los 40 años se define como «enfermedad de Parkinson de inicio temprano», y se presenta con las mismas características que en los pacientes de más edad. La enfermedad de «inicio juvenil» (antes de los 20 años) se diferencia por una mayor frecuencia de historia familiar de EP y por la presencia de distonía al inicio (Muthane, 1994). En los últimos años se ha reconocido que una alta proporción de pacientes con EP de inicio joven tiene la mutación del gen parkina, y recientemente se ha encontrado un locus en el cromosoma 1p35-36, conocido como parkina-6, en las familias con EP de comienzo también joven (edad promedio, 38 años). En ambos casos, el patrón hereditario es autosómico recesivo, pero el fenómeno clínico es muy similar al de pacientes sin componente hereditario. El mismo planteamiento se puede hacer para la forma dominante asociada al gen alfa-sinucleína, cuya edad de inicio (46 años) está también claramente por debajo de la media de EP esporádica. Por lo tanto, la edad de inicio de la EP se convierte así en una variable de capital importancia en la aparición y evolución del progreso degenerativo (Obeso, 1995).

En 1997 Polymeropoulos y colaboradores localizaron por análisis de ligamento, en la región 4q21-q23, el primer locus asociado a esta patología en una familia de origen italiano con EP con 7 individuos afectados. El análisis molecular de esta familia identificó al gen que codifica la proteína alfa-sinucleína (PARK 1, OMIM: 601508) como el factor genético asociado a la EP. También se ha identificado en una familia alemana una nueva mutación en PARK1 que consistía en el cambio de la base de guanina por citosina gÆc en la posición nucleotídica 88 de la secuencia codificante del gen que se asocia a EP (Moore *et al.*, 2005). La implicación del alfa-sinucleína en la EP Familiar significó un enorme progreso en el conocimiento de las causas de esta enfermedad en los casos esporádicos, puesto que esta proteína es el constituyente principal de los Cuerpos de Lewy la marca patológica de esta enfermedad.

El parkinsonismo juvenil, descrito por primera vez en familias consanguíneas japonesas, muestra una marcada similitud clínica a la EP con las siguientes características particulares: presentación temprana (típicamente antes de los 40 años) distonía en los comienzos de la enfermedad, fluctuaciones diurnas, severas disquinesias inducidas por la L-Dopa (Levo-dihidroxifenilalanina) y ausencia de los cuerpos de Lewy en los cerebros de los pacientes. El análisis molecular de familias en todo el mundo ha permitido la identificación de un gen en el cromosoma 6 y dos loci en el cromosoma 1 implicados en esta forma de parkinsonismo (Hoenicka, 2002).

Estudios epidemiológicos han marcado diferencias sexuales en la incidencia de ciertas enfermedades neurológicas. Se ha demostrado que hay un marcado dimorfismo sexual en la incidencia de la EP, encontrando una mayor susceptibilidad en los hombres comparado con las mujeres (Murray, 2003). Li y colaboradores (1985) reportan una prevalencia en varones tres veces superior a la de las mujeres.

Una teoría que ha tenido mayor atención por parte de los investigadores es la que se refiere a la hipótesis de los radicales libres en el envejecimiento; fue propuesta por Gerschman y Harman en los inicios de la década de los 50, en un momento en que se conocía relativamente poco sobre los sitios celulares de generación de los radicales libres y sus subsecuentes reacciones moleculares. El dogma central de esta teoría se basa en que durante el metabolismo aerobio se producen de forma incidental e incontrolable especies reactivas derivadas del oxígeno, que una vez generadas promueven reacciones que dañan las macromoléculas. Este daño irreversible se acumula con el tiempo y da como resultado la pérdida gradual de la capacidad funcional de la célula (González-Fraguela, 1999).

El estrés oxidativo en la patogenia de distintas enfermedades se refiere a un desbalance entre la formación de radicales libres (RL), como el radical superóxido (O_2^-), o el radical hidroxilo ($OH\bullet$), y Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) como lo es el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), además de los procesos de defensa antioxidante. El daño oxidativo está involucrado directamente en diversas afecciones del sistema nervioso central tales como la isquemia cerebral, el traumatismo craneoencefálico y enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP, la enfermedad de Alzheimer o la Esclerosis Lateral Amiotrófica. La hipótesis de que los RL y el estrés oxidativo contribuyen de manera sustancial en la patogénesis de la EP deriva fundamentalmente de los datos bioquímicos e histopatológicos, puestos en evidencia en tejido de pacientes parkinsonianos y se apoya en hallazgos de estudios *in vitro*, y de la experimentación animal, como el modelo de la EP inducido por la 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) o el potencial efecto neurotóxico de la L-Dopa (Larumbe, 1995; Rios de Molina, 2003).

El estrés oxidativo induce en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis. Este daño oxidativo es común en las EN, y aun no está claro si contribuye iniciando el proceso o es una

consecuencia del mismo. La formación de lípidos modificados por oxidación puede causar disfunción celular y muerte en células postmitóticas como las neuronas. La peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados en las membranas celulares inicia un deterioro acumulativo de las funciones membranales y provoca disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y el aumento en la permeabilidad de la membrana (Dorado *et al.*, 2003).

Como ya se mencionó, la alteración central de la EP es la muerte de las neuronas de la SNc, con el resultado de la degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal y la pérdida marcada del contenido de DA en el estriado (Hornykiewicz, 1966). Para tener un modelo animal de la EP, entonces se requiere destruir las neuronas del sistema nigroestriatal y corroborar que esto se acompañe de la pérdida de dopamina en los núcleos blanco de este sistema, lo que puede lograrse empleando neurotoxinas que destruyen selectivamente estas células. Las toxinas más comúnmente empleadas son la 6-Hidroxi-dopamina (6-OHDA) en ratas y el MPTP en Primates (Winn, 1991; Obeso, 1995; Galván, 2000).

La 6-OHDA, un análogo hidroxilado de la dopamina, se emplea comúnmente como una herramienta farmacológica. Su estructura química es muy similar a la de las catecolaminas, de tal modo que al ser administrada intracerebralmente a animales experimentales, los sistemas de recaptura de las neuronas catecolaminérgicas transportan este falso neurotransmisor a su interior, en donde se acumula. Como es altamente electroactiva, la 6-OHDA rápidamente se oxida, dando origen a varios compuestos citotóxicos, como RL y H_2O_2 que provocan la destrucción de la célula, principalmente destruyendo la membrana celular (Schwartz y Huston, 1999).

La 6-OHDA es la neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de EP en roedores. Cuando es administrada por vía sistémica destruye las neuronas adrenérgicas de los ganglios simpáticos pero carece de acción tóxica a nivel del sistema nervioso central. Sin embargo, la

inyección intracerebral de 6-OHDA produce la destrucción selectiva de las neuronas catecolaminérgicas. Esta especificidad es debida a su alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas. Ungersted en 1968 describió por primera vez que la inyección intracerebral por medios estereotáxicos de 6-OHDA en el haz nigroestriatal induce lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Schwartz y Huston, 1999).

Aunque existen estudios que demuestran que la 6-OHDA posee una potente acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial, la muerte neuronal dopaminérgica inducida por esta neurotoxina está ligada fundamentalmente a la formación de H_2O_2 , radicales OH y quinonas que se producen en su metabolismo. Así, sustancias antioxidantes como la vitamina E o N-acetil-cisteína, inhibidores de la MAO y quelantes del hierro como la desferroxamina protegen a las neuronas dopaminérgicas de la acción neurotóxica de la 6-OHDA. Desde el punto de vista histológico, en general la lesión de la SN inducida por 6-OHDA es más extensa que la que se observa en los pacientes parkinsonianos. Por ello, algunos autores han propuesto utilizar como modelo de EP la inyección de 6-OHDA directamente en la SN pars compacta evitando de esta manera la afectación de las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (A_{10}) que contiene neuronas dopaminérgicas y se localiza adyacente a la SNc (Luquin, 1994).

Comúnmente la inyección de esta neurotoxina se realiza de manera unilateral, ya que al hacerlo bilateralmente los animales quedan en estado atáxico y con afagia, dificultándose su sobrevivencia. En el caso de la rata lesionada unilateralmente con 6-OHDA, presenta un desbalance motor que puede no ser obvio con la simple observación. Sin embargo, al ajustar su postura y moverse, el animal presenta impedimentos en las extremidades contralaterales a la lesión; obligando a los animales a compensar esta deficiencia soportándose en la pata trasera intacta, usando la pata afectada y la cola para equilibrarse. Parece que las extremidades afectadas no son capaces de ejercer fuerza para acomodar la postura y producir movimiento. Además la rata puede presentar giro espontáneo hacia el lado lesionado (ipsilateral a la lesión) en los primeros días posteriores a la aplicación de

la toxina estos giros suelen aparecer sobre todo en situaciones potencialmente estresantes para el animal (Schwartz y Huston, 1999).

Al observar la conducta motora mediante el empleo de agonistas dopaminérgicos Ungertedt (1971b) encontró que al aplicar agonistas directos, como la apomorfina, las ratas inyectadas unilateralmente con la 6-OHDA presentaban movimientos rotatorios hacia el lado contralateral a la lesión. Este hecho se explica por el incremento en el número de receptores dopaminérgicos en el lado afectado; fenómeno conocido como hipersensibilidad por desnervación, y que surge a partir de la necesidad del sistema para aprovechar la dopamina existente (Ungerstedt 1971 a;b). El giro es debido al desequilibrio que existe entre el contenido de DA en el estriado ipsilateral y el estriado contralateral a la lesión, de tal forma que el animal tiende a rotar siempre hacia el lado contralateral al estriado más activo (Pavon, 1998; Luquin y Saldise, 1997).

Ambas observaciones indican que el balance dopaminérgico es necesario para mantener la postura y el equilibrio normales, que permite un desplazamiento eficaz, alternando la fuerza y el movimiento de las cuatro patas. En estos animales también se presenta deficiencia sensorial del lado ipsilateral a la lesión, de tal modo que el animal ignora o desatiende estímulos sensoriales, principalmente táctiles (Schwartz y Huston, 1999).

El MPTP es un derivado meperidínico. Su capacidad de inducir un síndrome parkinsoniano fue descubierta de forma accidental en un grupo de heroinómanos que de forma accidental se inyectaron esta sustancia. Estos sujetos mostraban un síndrome parkinsoniano indistinguible desde el punto de vista semiológico de la EP y toda su sintomatología se revertía con L-Dopa o agonistas dopaminérgicos. Posteriormente se comprobó que su administración a animales de laboratorio y fundamentalmente a primates, producía un síndrome parkinsoniano asociado a la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Luquin, 1994).

La MPTP es una toxina que afecta a las mitocondrias, causando destrucción selectiva de las neuronas de la SNc. La administración sistémica de MPTP reduce entre el 80 y 85% el número de neuronas dopaminérgicas en la SNc, al igual que la concentración de DA y sus metabolitos (Langston *et al.*, 1984; Machado, 2005).

Estas dos toxinas (6-OHDA y MPTP) son de uso frecuente en los modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson, en el caso de este trabajo emplearemos el modelo inducido con 6-OHDA inyectándola de manera unilateral en el haz medial del cerebro anterior de ratas. Este modelo tiene la ventaja de permitir la aplicación unilateral de la neurotoxina, conservando el lado intacto como control, y como es el modelo mas ampliamente empleado las pruebas conductuales están bien establecidas.

Para analizar el grado del daño ocasionado sobre la conducta motora de animales lesionados con 6-OHDA, se han realizado una serie de pruebas motoras en las que el animal debe aprender a emplear con destreza sus extremidades delanteras para presionar o jalar palancas, o tomar pequeñas pastillas de alimentos de rendijas o escalones. En el caso de las ratas, diversas pruebas de este tipo han demostrado que el animal con deficiencia unilateral de dopamina presenta incapacidad profunda y duradera en el uso de la pata contralateral a la lesión (Schwartz y Huston, 1996). Whishaw y colaboradores (Metz *et al.*, 2001), realizaron varios trabajos en donde analizan cuidadosamente en que consisten las diferencias que presenta la rata tratada con 6-OHDA en pruebas motoras que implican el uso diestro de las patas delanteras. Así, han descrito que el animal presenta dificultad para dirigir la extremidad, para pronar y supinar la mano, y usar los dígitos para tomar las pastillas de alimento (Miklyaeva *et al.*, 1994), estos animales no parecen ser capaces de usar sus patas delanteras para manipular los trozos de comida, abrir los dígitos para liberar la comida, o volver a soportar el peso de su cuerpo una vez que se consumió la comida. Las extremidades afectadas por la lesión no ayudan a los cambios posturales necesarios para alcanzar el alimento, lo que sugiere que uno de los principales defectos de la falta

de dopamina es la pérdida de la habilidad para aplicar fuerza con las extremidades afectadas, y por lo tanto, de iniciar cambios de postura (Miklyeva, 1996).

La prueba de la escalera o de las habilidades manuales es un tipo de evaluación conductual que se emplea para medir el déficit motor presente en las extremidades anteriores de ratas con lesión unilateral de la vía nigroestriatal. Esta prueba nos permite medir de manera independiente y cuantificable el uso de ambas extremidades anteriores para recolectar alimento y llevarlos a la boca (Pavón, 1998b).

Para probar habilidades de ejecución, se han diseñado distintas pruebas para que los animales alcancen un objetivo. Uno de éstos, es la ya mencionada prueba de la escalera, la cual fue introducida en 1990 por Montoya y colaboradores, y se ha utilizado posteriormente para detectar lesiones sensibles en la corteza motora, el estriado (Pavón, 1998b), el núcleo subtalámico, el Globo Pálido (Galván, 2000), o el núcleo tegmental pedunculopontino; y los efectos restaurativos de los trasplantes neuronales (Galván, 2000).

Diversas pruebas de coordinación motora que requieren balance y equilibrio están disponibles para roedores: la viga de madera, de secuencia suspendida, la tabla con hoyos, son ejemplos en los cuales los animales son libres de moverse sobre una superficie estacionaria pero estrecha. Por lo contrario, la viga rotatoria, la rejilla rotatoria y la rueda son ejemplos de pruebas en los cuales los animales son forzados a ajustar su postura en respuesta al movimiento de la superficie. Sin embargo, bajo cualquiera de estas condiciones, se mide el equilibrio dinámico, pues los animales pueden moverse siempre que ocurra la pérdida de equilibrio (Hilber, 1999).

Este tipo de pruebas conductuales han sido diseñadas y acondicionadas para evaluar la conducta motora de ratas y ratones. También se diseñan pruebas para observar el comportamiento libre en campos abiertos, ya que se ha mostrado que

los animales con déficit dopaminérgico cambian sus patrones de conducta. La prueba de este tipo mas empleada es la prueba de campo abierto, que de manera relativamente sencilla permite registrar el grado de movilidad de los animales, consiste en poner al sujeto en un espacio cercado y registrar su desplazamiento y actividades de exploración: generalmente el pararse en dos patas, que mide el grado de exploración conducta habitual en los animales normales; y el acicalamiento, actividad a la cual se dedican los animales una vez saciada su curiosidad y que implica cierto grado de coordinación motora. Cabe aclarar que comúnmente la prueba de campo abierto se emplea para medir la actividad motora y/o el nivel de ansiedad (la ansiedad se mide en relación a la tendencia de los roedores a permanecer pegados a las paredes para no estar expuestos), en el caso de la ansiedad esta variable se elimina si previamente se habitúa a los animales al entorno.

Tratamientos

El tratamiento de la EP sigue siendo un problema de difícil solución. Desde que se entendió que la enfermedad se debía a una deficiencia de suministro de DA se han establecido diversas estrategias farmacológicas con el objeto de minimizar los síntomas de esta enfermedad y mejorar la función dopaminérgica.

En la actualidad la farmacología desarrolla dos líneas de acción, una etiopatogénica que tiene como objetivo detener la muerte celular y fomentar la recuperación de las poblaciones celulares ya afectadas mediante la búsqueda de fármacos que modulen las rutas bioquímicas implicadas en estos procesos; la segunda línea de acción mucho más avanzada hasta la fecha, es la fisiopatológica, que busca prevenir, retardar o paliar la aparición de la sintomatología propia de la alteración en los niveles de neurotransmisión, y presentar como objetivo principal el mantenimiento de los mismos (Segura *et al.*, 2003).

El fármaco más utilizado en el tratamiento de la EP es la L-DOPA, ésta se forma a partir del aminoácido L-tiroxina, como uno de los pasos intermedios en la síntesis de catecolaminas, la DA se sintetiza por la descarboxilación de este aminoácido. A partir de 1967 se inicia su introducción como farmacoterapia: Cotzias y cols. (1967) reportan que la administración oral de L-DOPA provoca efectos benéficos sostenidos y dramáticos en pacientes con EP. Posteriormente se establece que produce efectos anti-rigidez (Cotzias, 1967). Investigaciones más recientes reportan que este fármaco tiene efectos transitorios cuando es administrada a bajas dosis (Tolosa *et al.*, 1998). En administraciones a corto plazo, la L-DOPA revierte algunos de los déficits motores de dicha enfermedad, a través de su

conversión a DA sin embargo cuando se administra a largo plazo o se incrementa la dosis este fármaco pierde eficacia y frecuentemente aparecen serios efectos colaterales como las oscilaciones motoras on-off y discinesias, sin que los pacientes presenten algún tipo de mejoría (Wolters *et al.*, 1995; Jenner, 1995).

La L-DOPA es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, siendo el fármaco más eficaz en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. La L-DOPA se absorbe bien en el intestino delgado, aunque es inactivada en una gran proporción, en algunos casos en un 95%, por la presencia de la mono amino oxidasa periférica (MAO enzima que la cataliza), dando lugar a la aparición de efectos secundarios conocidos. Con el fin de evitar esta transformación periférica se suele coadministrar junto a fármacos inhibidores de la descarboxilasa, como la carbidopa o la benseracida, incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y de esta manera no sólo se evitan los efectos secundarios sino que se reduce unas 10 veces las dosis de levodopa necesarias (Costa, 2001; Metz *et al.*, 2001).

La respuesta al tratamiento es rápida, de tal forma que si con dosis de 1 gr/día los pacientes no mejoran habrá que pensar en que no se trata de una EP idiopática no obstante el uso de la L-DOPA tiene efectos secundarios tales como : A) náusea, vómito o la disminución del apetito que pueden aparecer al comienzo del tratamiento o al ir aumentando la dosis. Se produce por la presencia de DA en la sangre y sus efectos se pueden contrarrestar tomando las tabletas con un poco de alimento salado o dulce. B) Efectos secundarios de tipo cardiovasculares: Hipotensión ortostática. Este síntoma puede exacerbarse principalmente durante las primeras semanas de tratamiento, pudiendo minimizarse con la introducción progresiva de la levodopa, o una disminución de la dosis en caso de que el tratamiento ya esté iniciado. C) Alteraciones mentales y del sueño: aunque la levodopa puede producir alucinaciones es, de todos los fármacos utilizados en la EP, el que menos frecuentemente la induce. D) Alteraciones de la termorregulación, excepcionalmente puede producirse hipertermia severa después de la administración de levodopa, en cuyo caso habrá que descartar un síndrome

neurotóxico maligno y actuar con prontitud, introduciendo los agentes dopaminérgicos. E) Alteraciones motoras: fluctuaciones motoras y discinesias. Pueden aparecer a partir de los 2-3 años de iniciarse el tratamiento. Tras cinco años de tratamiento el 59% de los pacientes presenta fluctuaciones motoras y el 41% discinesias. Son estas las razones por las que existen controversias sobre cuándo iniciar el tratamiento con este fármaco, principalmente en pacientes menores de 60 años (Costa, 2001).

Existe cierta controversia sobre cuál es el fármaco de elección para el inicio de la terapia pues aunque la L-DOPA es decididamente más potente, se especula que podría ser una de las causas de las complicaciones en el largo plazo y por esta razón algunos investigadores proponen el comienzo con agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, pramipexol, pergolida, ropinol, lisurida, cabergolina, apomorfina, piribedilo). Estos fármacos ocupan un lugar destacado en el tratamiento de la EP en sus diversas fases evolutivas (Balbuena, 2005).

Si bien la L-DOPA es actualmente el mejor tratamiento para la EP, la bromocriptina es una alternativa para prevenir y disminuir fluctuaciones motoras (Balbuena, 2005), Al parecer la bromocriptina es utilizada en las etapas iniciales de la EP ya que retarda las complicaciones motoras inducidas por la administración a largo plazo de la L-DOPA (Ramaker et al, 2000; Segura *et al.*, 2003). Sin embargo, reportes clínicos han mencionado que la Bromocriptina induce algunos efectos colaterales como náuseas, vómito (Ramaker *et al.*, 2000), cuadros de confusión y alucinaciones los cuales son frecuentes, y con el pasar del tiempo se produce una aparente disminución del beneficio (Molina et al, 1999).

El Piribedilo es un agonista dopaminérgico (D2-D3) eficaz en el control de síntomas parkinsonianos particularmente el temblor; existe un trabajo en el que se evaluó la eficacia y tolerancia del piribedil como terapia adjunta a la levodopa, se realizó un seguimiento de 9 meses en pacientes que estaban tratados con levodopa y con deterioro funcional. La eficacia se valoró con las partes II y III de la

escala unificada para la valoración de la EP (UPDRS) y la tolerancia con un cuestionario para detectar efectos adversos. Los pacientes que tomaron piribedil mostraron mejoría progresiva y sostenible en la parte II y III del UPDRS durante 9 meses al agregarse 150 mg por día como terapia adjunta a la levodopa y los efectos adversos fueron similares a los comunicados por otros agonistas dopaminérgicos. También mostraron disminución del temblor en reposo así como el resto de los síntomas cardinales del Parkinson (Balbuena, 2005).

La apomorfina es un agonista dopaminérgico D2 probablemente subutilizado pese a su eficacia en situaciones en las que han fracasado otras medicaciones o no existe indicación para la cirugía estereotáxica. Su rapidez de acción (7 a 10 minutos) y su potencia semejante a la L-DOPA le permite reducir fluctuaciones motoras graves, distonias en off, discinecias bifásicas o síntomas como la disfagia o dificultades miccionales. A diferencia de otros agonistas, su capacidad para inducir complicaciones neuropsiquiátricas es menor pero sus mayores inconvenientes en la práctica son su breve duración (menos de 60 minutos) y la necesidad de que se utilice por vía subcutánea (Balbuena, 2005). La N-acetil-5-Metoxitriptamina (Melatonina) es una sustancia que ha sido ampliamente estudiada debido a que se le han atribuido importantes propiedades antioxidantes (Reiter et al., 2003; Piñol-Ripoll et al., 2006), inclusive se ha reportado que la Melatonina es un potente antioxidante dos veces más eficiente que la vitamina E y cuatro veces más que el Glutathion Peroxidasa (GSH) y el ácido ascórbico (Kundurovic y Sofic., 2006; Nam y cols. 2005), estos autores reportaron que en un modelo de la EH produciendo lesión de las neuronas estriatales mediante mecanismos secundarios excitotóxicos mediados por estrés oxidativo, los animales que recibieron tratamiento intraperitoneal con Melatonina, presentaron menores niveles de peroxidación de lípidos, en comparación con los que no recibieron el tratamiento. Además la neurotoxina utilizada induce decremento en los niveles de DA, dicho decremento fue atenuado por el tratamiento con la Melatonina. Finalmente los autores sugieren que el tratamiento con Melatonina no solo reduce la muerte neuronal estriatal, sino también la pérdida de terminales

dopaminérgicas que proyectan al estriado, por lo que sugieren que la Melatonina podría ser utilizada en el tratamiento de EN.

A continuación hablaremos con más detalle sobre esta sustancia pues fue uno de los tratamientos que empleamos en este trabajo.

A finales de la década de los cincuenta, se aisló y se identificó por primera vez una hormona segregada en la glándula pineal, a la que se le dio el nombre de Melatonina. Su importancia ha aumentado en forma exponencial ya que cada vez se descubren nuevas evidencias de su participación en la regulación biológica del ritmo circadiano, en el sueño, en el humor, en el envejecimiento, en el crecimiento tumoral y en la reproducción. Y quizá se haya abierto el camino para su indicación terapéutica en muchos otros procesos más actuales e importantes, como la neuroprotección, la migraña o el control de las crisis epilépticas (Rufo-Campos, 2002).

La Melatonina se sintetiza en la base del cerebro a partir de las moléculas del triptófano en la glándula pineal muy vascularizada compuesta por dos tipos de células: las células neurogliales y los pinealocitos que predominan en número y que producen dos tipos de sustancias: las indolamidas (entre las que se encuentra ubicada la Melatonina) y los péptidos (Rufo-Campos, 2002; Cubero, 2003).

Una gran cantidad de la sustancia se metaboliza rápidamente en el hígado, mediante la transformación de Melatonina a 6-hidroximelatonina a través de un proceso de hidroxilación. Posteriormente se conjuga con el ácido glucorónico y el ácido sulfúrico, y se excreta por la orina en forma de su principal metabolito, la 6-sulfato-hidroxi-melatonina, en estrecha relación con las concentraciones séricas de melatonina.

Así mismo se ha podido demostrar que tras su administración intravenosa la melatonina tiene una semivida sérica que varía entre 0.5 y 0.6 min, y que tan

rápidamente como se distribuye, es eliminada. La biodisponibilidad de la melatonina cuando se administra en forma oral es mucho más extensa (Venero *et al.*, 2002). De esta manera cuando una persona sana ingiere una cápsula de gelatina de dicha sustancia con una dosis de 80 mg las concentraciones séricas de melatonina se incrementan entre los 60 y los 150 min posteriores a la toma, hasta en 10,000 veces el valor del pico máximo nocturno, y estos valores permanecen estables durante más de 90 min.

JUSTIFICACIÓN

En nuestro laboratorio se han analizado las alteraciones ultraestructurales inducidas en el cuerpo estriado de personas que padecieron la EP o utilizando el modelo animal de dicha enfermedad (aplicación unilateral de 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior de rata). encontrando que en ambos casos se presenta aumento del diámetro de los botones sinápticos y pérdida de los contactos sinápticos establecidos con espinas dendríticas(Avila-Costa et al., 1998). Posteriormente mostramos que en los animales con inyección unilateral de 6-OHDA el empleo del agonista dopaminérgico L-DOPA no previene las alteraciones ultraestructurales inducidas por la aplicación de la neurotoxina(Gutiérrez, 2004). Con el mismo modelo animal hemos reportado que a nivel ultraestructural el empleo de antioxidantes (Bromocriptina y Taurina) tienen un efecto mínimo sobre las alteraciones que se presentan en el núcleo caudado de los animales tratados(Ordóñez-Librado, 2004).

Las investigaciones se han enfocado en el análisis del daño que provoca la inyección de la neurotoxina 6-OHDA, y el efecto de diversos fármacos a nivel ultraestructural, dejando de lado el análisis de la conducta motora. El desempeño motor es un indicador del grado de afección de la enfermedad y el síntoma más relevante, de tal forma que los tratamientos están diseñados para evitar en lo posible la manifestación de alteraciones motoras, es por ello que el interés de esta investigación se basa en analizar la conducta motora fina en ratas lesionadas unilateralmente sometidas a dos tipos de tratamientos; para lo cual se emplearon tres diferentes pruebas motoras, dos de ejecución y una de conducta libre.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto que tiene la L-DOPA y la Melatonina sobre el desempeño en pruebas que evalúan la coordinación motora, en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA.

OBJETIVO PARTICULAR

- Determinar si el tratamiento con la L-dopa y la Melatonina favorece la recuperación de la coordinación motora fina y gruesa en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA.

METODO

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron 15 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso inicial de 190 ± 10 gr, las cuales se mantuvieron en un ciclo luz-oscuridad de 12:00 hrs con libre acceso a agua y comida (excepto los días de evaluación).

Adiestramiento:

Prueba de la viga- los animales fueron entrenados durante cinco días en la prueba de la viga, esta prueba consiste en colocar una viga de madera de dos metros de longitud, con una inclinación de 30 grados sobre un soporte en cada extremo, y la viga puede ser de uno de cinco diferentes grosores: 3, 6, 12, 18 y 24 mm. En el extremo mas alto se coloca la caja hogar de la rata, que será el destino una vez que se coloque la rata en el otro extremo y esta recorra la viga de equilibrio (ver Fig. 1). El primer día de entrenamiento se coloca la viga de 24 mm de forma horizontal y en un extremo la caja hogar para que los animales lleguen a ella después de recorrer la viga, se realizó el entrenamiento con estas condiciones durante tres ocasiones, y después otras dos colocando la viga de forma inclinada (inclinación de 30 grados). Esto se realiza el primer día para que los animales se vayan familiarizando con la prueba. Cabe mencionar que este día no se toma el tiempo de la ejecución de los animales sobre las vigas.

El segundo, tercer y cuarto día de entrenamiento solo se pasó a los animales una vez sobre la viga inclinada. En el quinto día de evaluación se pasaron los animales una vez por todas las vigas (diferentes grosores), y se registró el tiempo de ejecución, es decir, el tiempo que se tardaron los animales en recorrerla de extremo a extremo. También se registró el tiempo que los animales permanecían sin movimiento sobre la viga. Estos tiempos fueron tomados como la evaluación control.

Se excluyó a los animales que se negaban a hacer el recorrido de la viga de un extremo a otro, o lo hacían en más de 120 segundos (Gutiérrez, 2007).



Figura 1. Prueba de la Viga de Equilibrio. La rata debe de recorrer de un extremo a otro la longitud de la viga.

Prueba de campo abierto- para la evaluación de esta actividad se colocó a los animales uno por uno, en una superficie de 120 cm de largo por 120 de ancho y 20 cm de alto, esta superficie esta dividida por tres líneas formando cuadrantes de 30 cm a lo largo y ancho. Se registran las ocasiones en que: la rata cruza una línea para pasar a otro cuadrante, se para en dos patas, se acicala hasta que coloca sus patas delanteras en el piso, y el tiempo de no movimiento (ver figura 2). El registro de esta prueba se llevó de la siguiente manera: Se colocó a cada animal durante 15 minutos en el lugar de registro, los primeros 5 minutos se dejaba que el animal recorriera y explorara la superficie con la finalidad que se habituara con el lugar. Durante los siguiente 10 minutos se registraron todas las conductas que el animal presentó. Cabe mencionar que se cuidaron las variables de ruido, iluminación y horario. Los datos obtenidos se tomaron como evaluación control, se excluyó a aquellos animales que permanecieron inmóviles durante esta prueba (Machado y cols., 2005).



Figura 2. Evaluación de la conducta libre. Se puede observar que el área estaba dividida en cuadrantes.

Prueba de la Escalera. Por último para la evaluación conductual de ejecución se llevó a cabo la “Prueba de la Escalera”, la cual consiste en colocar a una rata dentro de una caja de acrílico. La caja cuenta con una escalera de 6 peldaños en cada lado y en cada peldaño se coloca un pedazo de comida, cuenta además con una superficie central donde se coloca a la rata, para que ésta alcance con sus extremidades superiores a cada lado de la caja el pedazo de comida colocado en los escalones de la escalera y lo lleve a su boca (ver fig 3).

Esta cajas de acrílico están constituidas por dos compartimentos conectados entre si; en el compartimiento mayor (21 cm de largo, 11 cm de ancho y 12 de alto) la rata puede descansar y moverse con mayor libertad, el compartimiento menor y donde entra la escalera (16 cm de largo, 7 cm de ancho y 12 cm de alto), cuenta con una plataforma central de 4.5 cm de alto y 13 cm de largo en donde la rata coloca el pecho de tal forma que se obstaculiza el movimiento cruzado de las extremidades superiores. En la parte inferior junto a la plataforma central, hay un peldaño de 3 cm de alto con la función de impedir el alcance de

los alimentos con las extremidades traseras. Las escaleras tienen 6 escalones (0.5 cm de alto cada uno) y cuenta con una cavidad en la parte central de cada peldaño donde se coloca el pedazo de alimento.

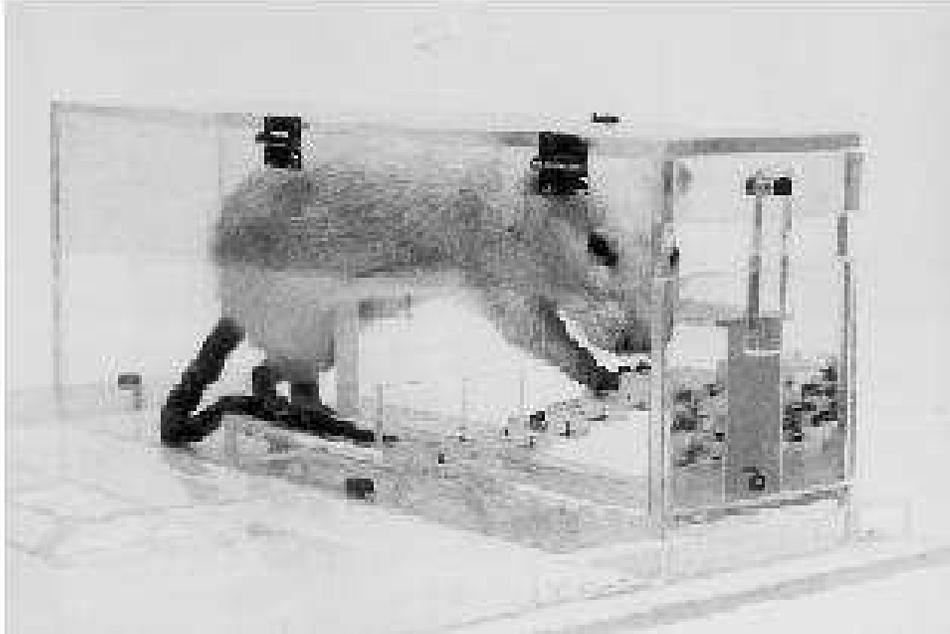


Figura 3. Prueba de la escalera. Con las extremidades superiores el animal tiene que alcanzar los trozos de alimento (colocados en cada uno de los peldaños de las escaleras) y llevarlos a su boca.

Durante los 7 días que duró el entrenamiento se restringió la cantidad de alimento, de tal modo que las ratas se mantuvieran al 85% de su peso control (determinado por un grupo paralelo que no tuvo restricción de alimento). Antes de iniciar cada sesión se colocaba un pedazo de alimento en cada escalón. Se controlaron las variables de iluminación, horario y ruido. Una vez al día las ratas se colocaban en la caja de la escalera, donde permanecían por 10 minutos. Con el fin de que se familiarizaran con la manera de recoger los pedazos de alimento, en las primeras sesiones se colocaba las escaleras 1 cm por encima de la superficie y se bajaban

progresivamente en las sesiones siguientes de acuerdo con el número de pedazos de alimento recogido. Si después de 7 sesiones el animal no tomaba ni comía por lo menos el 60% de las pastillas, era retirado del experimento.

Las conductas que se registraron en esta prueba fueron: Aciertos- agarrar los pedazos de alimento, llevarlos a la boca y comérselos. Intentos- inicia la acción de agarrar y llevárselos a la boca el alimento para comérselo pero sin haberlo tomado (Samsam, 2004).

Cabe señalar que el tiempo de entrenamiento de las diferentes pruebas conductuales (Viga de equilibrio, Campo libre y Prueba de la Escalera) así como las evaluaciones se llevaron a cabo durante diferentes días con el fin de cuidar la variable cansancio en los animales, y evitar la alteración de los resultados.

Lesión

Las ratas seleccionadas en base a las pruebas conductuales se lesionaron quirúrgicamente de la siguiente manera: Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg/kg de peso, vía intraperitoneal -i.p.-). Una vez que se han anestesiado se colocan en un aparato estereotáxico (ver figura 4), instrumento que permite el movimiento micrométrico en 3 ejes (adelante-atrás AP, derecha-izquierda L, y arriba-abajo V) permitiendo localizar de manera precisa y reproducible las estructuras cerebrales. Las coordenadas estereotáxicas para encontrar el haz medial, fueron las siguientes a partir de bregma: AP-3.2mm; L= 1.5 mm; V -7.5 mm a partir de la dura madre (de acuerdo al atlas estereotáxico del cerebro de rata de Paxinos y Watson, 1986). Las 15 ratas fueron lesionadas unilateralmente (lado izquierdo) en el haz medial del cerebro anterior inyectando 4 μ l de solución salina que contenía 8 μ l de 6-OHDA y 0.2 mg de ácido ascórbico como antioxidante.

Dos días después de la lesión con la finalidad de evaluar la conducta de giro inducido se les aplicó apomorfina (agonista dopaminérgico 0.25 mg/kg de peso i. p.). Se utilizaron sólo aquellos animales lesionados con 6-OHDA que dieron más de 200 giros en un periodo de 30 minutos.

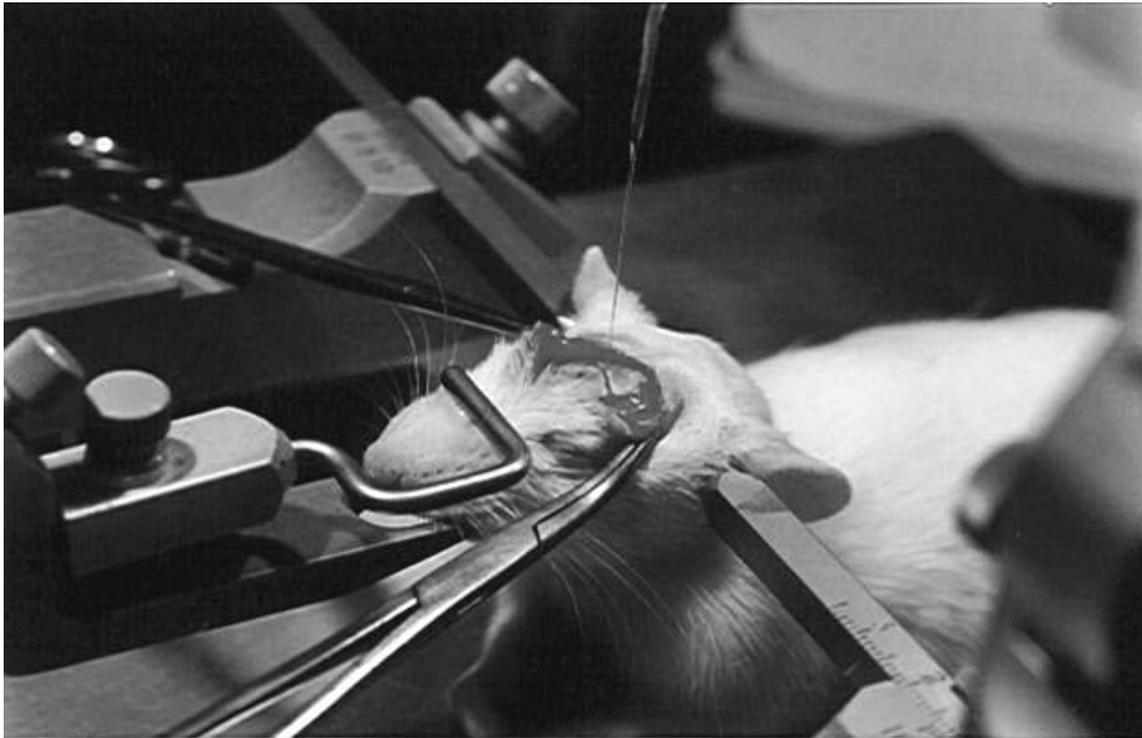


Figura 4. Colocación de la rata en el aparato estereotáxico. Se puede observar la punta de la cánula que se introduce para lesionar el haz medial empleando las coordenadas antes mencionadas.

24 horas después de la evaluación del giro inducido 5 ratas fueron tratadas diariamente con L-DOPA (15 mg/Kg de por vía oral) durante 30 días. Otras 5 ratas fueron tratadas diariamente con 10 mg/Kg de Melatonina por vía oral durante 30 días; y 6 ratas lesionadas no recibieron tratamiento manteniéndose durante el mismo tiempo.

Las evaluaciones conductuales se llevaron a cabo a los 7, 14, 21 y 28 días después de la lesión.

Para el análisis estadístico de nuestros resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Los resultados de las evaluaciones son las siguientes.

PRUEBA DE LA VIGA- durante esta prueba se midió el tiempo que tardaba cada animal en recorrer cada viga, recordemos que se emplearon vigas de 5 diferentes grosores (3, 6, 12, 18 y 24 mm). En la gráfica 1, se observa que antes de la lesión en general los animales recorrieron las diferentes vigas en un promedio de 19 ± 5 seg., con una ligera tendencia a disminuir el tiempo al recorrer las vigas de mayor grosor. Cabe señalar que esta tendencia se mantuvo en los tres diferentes grupos durante todas las evaluaciones.

En la primera evaluación, a los 7 días de tratamiento (gráfica 1), en el grupo de los animales tratados con L-DOPA (círculos rojos) tardan menos tiempo en recorrer las vigas, independientemente del grosor de éstas. Mientras que el grupo tratado con Melatonina (círculos verdes) tienen un desempeño similar al presentado por el grupo sin tratamiento (6-OHDA –círculos negros-).

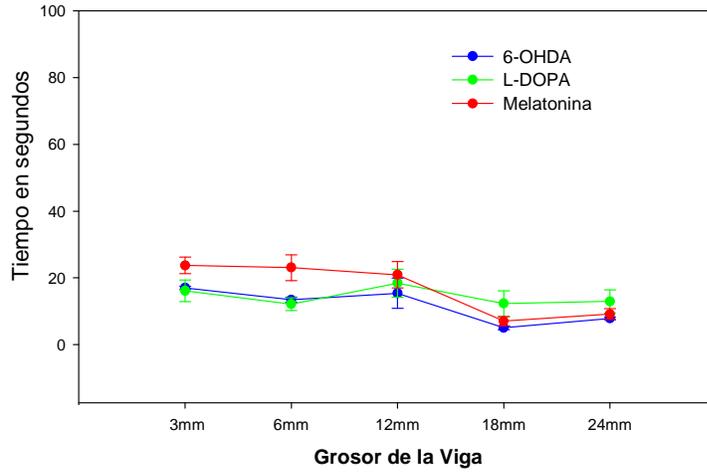
Hacia los 14 días de tratamiento el grupo tratado con L-Dopa muestra diferencias significativas con respecto al grupo 6-OHDA y al grupo tratado con Melatonina, empleando menos tiempo para recorrer las dos vigas de mayor grosor; no hubo diferencias significativas entre el grupo 6-OHDA y el grupo Melatonina.

Durante la evaluación llevada a cabo 21 días después del inicio de los tratamientos observamos un incremento en el tiempo promedio que requirieron los animales del grupo 6-OHDA para recorrer cada viga, con respecto a la evaluación control. En el caso del grupo tratado con Melatonina se registró disminución significativa en los tiempos requeridos para recorrer las vigas de 3, 12, 18 y 24 mm comparado con el grupo 6-OHDA; mientras que las ratas del grupo tratado con L-Dopa mostraron diferencias significativas en el tiempo de ejecución para cada viga con respecto al grupo sin tratamiento (6-OHDA). Cabe mencionar que se

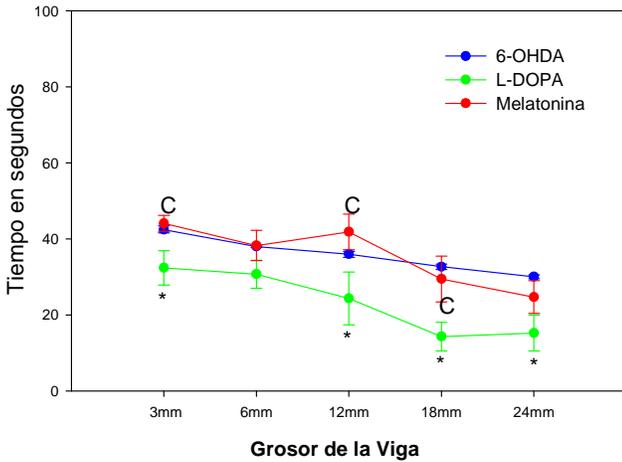
encuentran diferencias significativas en el tiempo de ejecución en las tres vigas de mayor grosor en el grupo tratado con L-DOPA requiriendo menos tiempo, con respecto a los otros grupos.

Finalmente hacia los 28 días después de iniciado el tratamiento observamos que el grupo 6-OHDA requiere mayor tiempo de ejecución para recorrer todas las vigas, con respecto a su evaluación previa y a los otros dos grupos que recibieron tratamiento. Hay que hacer notar que el grupo tratado con Melatonina requiere menos tiempo para recorrer todas las vigas con respecto a los otros dos grupos, excepto en la viga de 12 mm donde no hay diferencias significativas con respecto al grupo L-DOPA. Es importante mencionar que el grupo L-DOPA presenta un marcado incremento en los tiempos de recorrido de las vigas con respecto a su evaluación previa, e incluso respecto al grupo tratado con Melatonina.

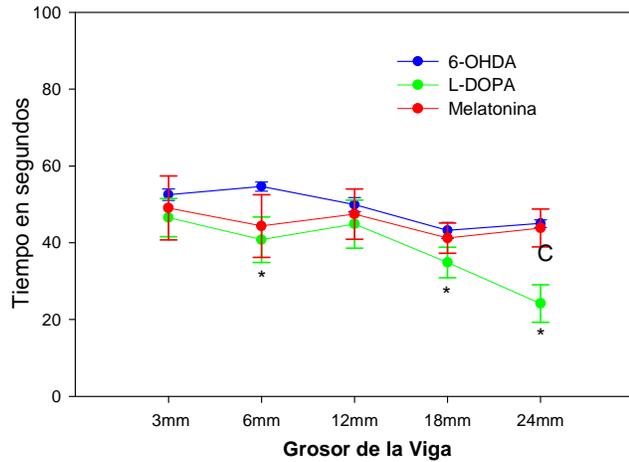
Antes de la lesión



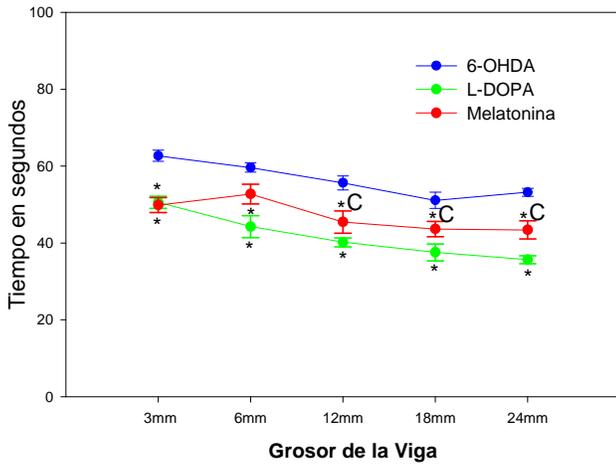
7 Días



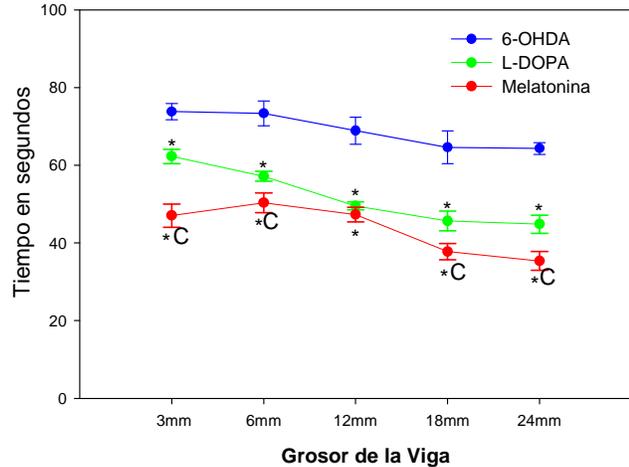
14 Días



21 Días



28 Días



Gráfica 1 Muestra los tiempos promedio empleados por los animales de cada grupo para atravesar las vigas de diferentes grosores a los diferentes tiempos de evaluación: A) antes de la lesión, B) a los 7 días, C) a los 14 días, D) a los 21 días y E) a los 28 días. Cabe destacar que el grupo tratado con Melatonina cada vez presenta un mejor desempeño en la prueba, mientras que el grupo sin tratamiento

(6-OHDA) y el tratado con L-Dopa van teniendo mayor dificultad en la realización de la misma. * = $P < 0.05$ vs 6-OHDA, C = $P < 0.05$ vs L-DOPA.

PRUEBA DE CAMPO ABIERTO

Durante la prueba de conducta libre evaluamos: acicalamiento, cruce de cuadrantes, pararse en dos patas y tiempo de no movimiento; los datos respectivos fueron los siguientes:

Cruzar las líneas: la gráfica 2A muestra un promedio de 75 ± 5 de las veces en que los animales cruzaron las líneas en la denominada prueba de campo abierto o conducta libre, realizada por cada una de animales de los tres grupos, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos Lesión (círculos azules), grupo L-DOPA (círculos verdes) y el grupo Melatonina (círculos rojos).

Para la primera y segunda evaluación se observa un decremento considerable en el número de líneas cruzadas por parte de los animales pertenecientes a los grupos tratados con Melatonina y el grupo que no recibió tratamiento. El grupo tratado con L-Dopa también tiene un ligero decremento en el promedio de las ocasiones que atraviesa las líneas, aunque no difiere significativamente de la evaluación control y guarda una diferencia significativa con respecto a los otros dos grupos.

Para la tercera y cuarta evaluación se observa un decremento significativo en el número de ocasiones que cruza las líneas el grupo tratado con L-Dopa con respecto a su evaluación previa. Aunque aún guarda una diferencia significativa con respecto al grupo que no recibió tratamiento, en el cual se mantiene la tendencia a disminuir el número de veces que cruza las líneas. Por otra parte, el grupo tratado con Melatonina incrementa el promedio de líneas cruzadas a partir de la tercera evaluación y más aun en la cuarta evaluación, observándose diferencias significativas con respecto a los otros dos grupos. Hay que notar que

en la última evaluación su desempeño fue similar al presentado durante la evaluación control.

Acicalarse: la gráfica 2B muestra el promedio del número de veces que las ratas se acicalaban en cada evaluación, en la evaluación control se observa al grupo Lesión con un promedio de 11 ± 1 acicaladas. El Grupo L-dopa tiene un promedio menor con respecto al grupo Lesión encontrándose una diferencia significativa entre ellos.

Al grupo tratado con Melatonina también tiene un promedio menor al grupo sin tratamiento pero más alto que el grupo tratado con L-Dopa. La diferencia del grupo Melatonina con respecto a los otros dos es significativa.

Con el paso del tiempo, en las subsiguientes evaluaciones, se observó que los animales pertenecientes a cada grupo tendían a acicalarse cada vez con menor frecuencia; es notorio que el grupo tratado con Melatonina muestra un incremento en el tiempo promedio empleado en acicalarse pero solo hasta la cuarta evaluación que corresponde a los 28 días de tratamiento.

Erguirse: se registró la conducta de erguirse o pararse en dos patas, se contabilizaba el número de ocasiones en que las rata se erguía durante los diez minutos que duro la observación.

En la gráfica 3A se muestran los valores promedio de las veces en que los animales se pararon en dos patas antes de la lesión la cual es de 26 ± 2 , así como las siguientes evaluaciones a los 7, 14, 21 y 28 días de tratamiento.

En las dos primeras evaluaciones se observa una disminución en el número de ocasiones en que los animales del grupo que no recibió tratamiento y del grupo tratado con Melatonina se erguían. Esta diferencia es estadísticamente significativa con respecto a la evaluación control, y con respecto al grupo tratado con L-Dopa, este grupo no presento cambios respecto a su evaluación control.

En la tercera evaluación, a los 21 días de tratamiento, se observa un ligero incremento en el número de ocasiones en que los animales del grupo tratado con Melatonina se paran en dos patas, con respecto a su evaluación previa y con respecto al grupo que no recibió tratamiento. Aunque se mantiene una diferencia significativa del grupo tratado con Melatonina con respecto al grupo tratado con L-Dopa, el cual presenta una disminución en el número de veces que se yerguen, con respecto a su evaluación previa.

En la cuarta evaluación se observa claramente que los animales del grupo tratado con L-Dopa tienen un decremento considerable en el número de veces que se paran en dos patas, con respecto a su evaluación previa. Teniendo un puntaje similar al grupo que no recibió tratamiento. Por otra parte, el grupo tratado con Melatonina incrementa el número de veces que se para en dos patas, con respecto a su evaluación previa, alcanzando valores próximos a los obtenidos en la evaluación control. Existe diferencia significativa entre el grupo Melatonina y los otros dos grupos.

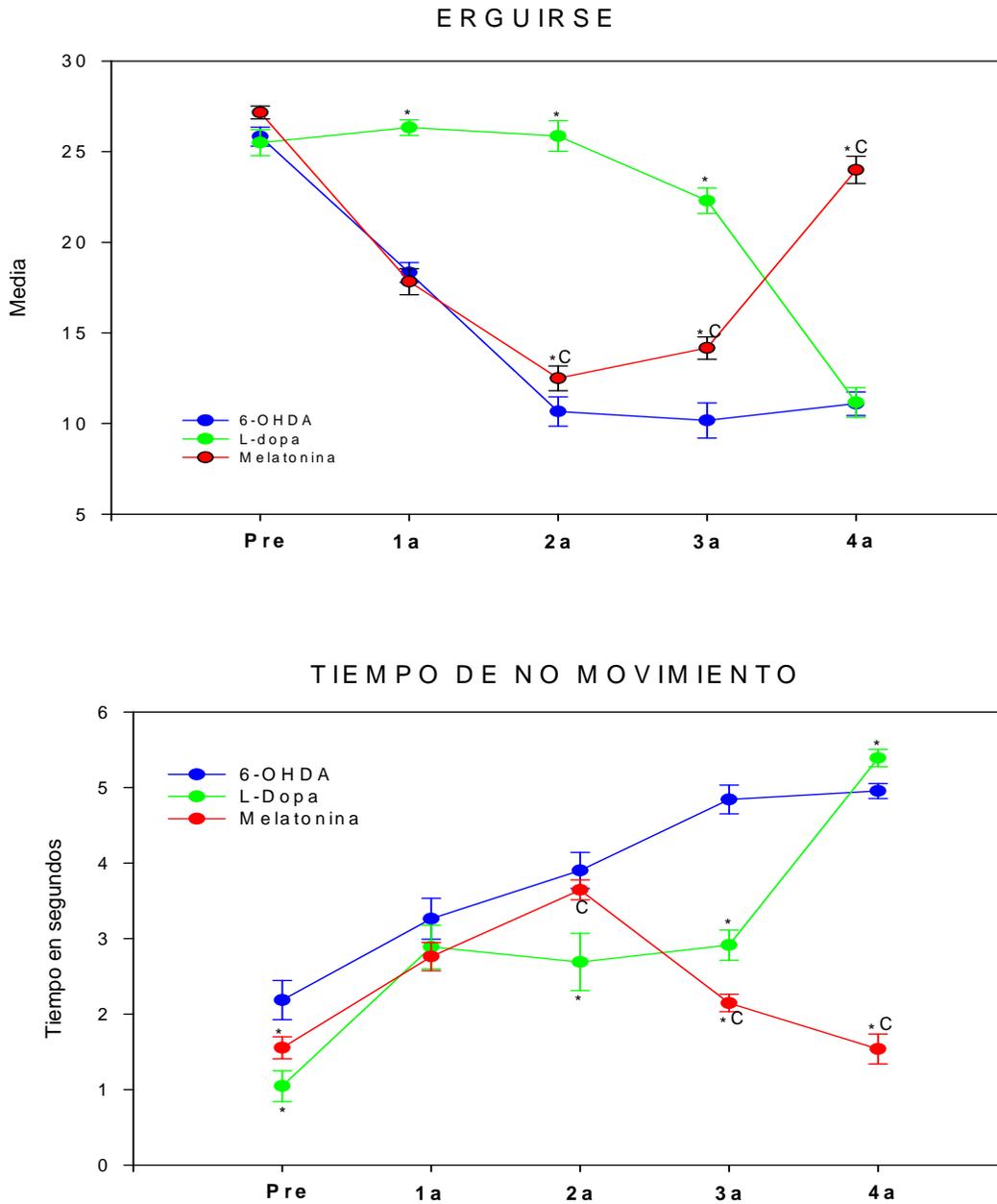
Tiempo de no movimiento: la gráfica 3B muestra el tiempo en que los animales permanecían sin movimiento, para lo cual primeramente se observa en la evaluación control, los grupos L-Dopa (Círculos de color verde) y Melatonina (Círculos de color rojo) fue apenas por arriba del minuto en promedio, mostrando una diferencia con respecto al grupo Lesión (Círculos de color azul), el cual permaneció por arriba de los dos minutos sin movimiento.

En la primera evaluación, a los siete días, no se observa diferencias entre los tres grupos, pues los tres estuvieron en promedio cerca de los tres minutos sin movimiento. En todos los casos se observa un incremento en el tiempo de no movimiento con respecto a su evaluación anterior.

En la segunda evaluación observamos que el grupo que recibió tratamiento con L-Dopa disminuye su tiempo de no movimiento con respecto a los otros dos grupos L-Dopa y Lesión, observándose una diferencia significativa para con ellos.

Para la tercera evaluación el tiempo de no movimiento se incrementa para el grupo que no recibió tratamiento. De forma contraria el grupo tratado con Melatonina disminuye el tiempo de no movimiento significativamente con respecto a su evaluación previa. Se observa una diferencia significativa con respecto a los otros dos grupos.

En la última evaluación el grupo tratado con Melatonina disminuye su tiempo de no movimiento con respecto a su evaluación previa. Se observa una diferencia aun mayor con respecto a los otros dos grupos, los cuales incrementan el tiempo de no movimiento.



Gráfica 3 muestra los promedios de las evaluaciones de los grupos lesión (círculos azules), L-Dopa (círculos verdes) y Melatonina (círculos Rojos). A) muestra el promedio de las veces en que las ratas se yerguen. B) muestra el promedio del tiempo en que las ratas permanecen sin movimiento. * = $P < 0.05$ vs 6-OHDA, C= $P < 0.05$ vs L-DOPA.

PRUEBA DE LA ESCALERA

Gracias al diseño de la caja con que se realiza esta prueba se puede analizar el desempeño de los animales y relacionarlo con el control que tienen sobre los movimientos de cada miembro, es decir se puede medir la habilidad a través del número de intentos y/o aciertos para coger el trozo de alimento con cada pata delantera, ipsilateral o contralateral a la lesión.

Aciertos con el miembro contralateral: En la Gráfica 4^a se pueden observar los valores de la media del número de los aciertos de cada animal para llevarse los trozos de comida a la boca con el miembro contralateral a la lesión. Cabe mencionar que el acierto se toma como prensar el trozo de comida con la extremidad superior, llevarlo hasta la boca y comerlo. Podemos ver que en la evaluación control la media fue de 4.5 ± 0.5 para los tres grupos, no encontrándose diferencias significativas entre ellos.

En la primera evaluación podemos observar que los tres grupos tienen un decremento en el número promedio de aciertos en que se llevaron a la boca los trozos de comida, con respecto a su evaluación anterior. No encontrándose diferencias significativas entre los grupos.

Para la segunda evaluación podemos observar el mismo patrón de decremento por parte de los grupos Lesión y el grupo tratado con Melatonina en la ejecución del movimiento para llevarse los trozos de comida a la boca con el miembro contralateral a la lesión, no encontrándose diferencias significativa entre ambos grupos. Mientras que el grupo tratado con L-Dopa muestra un ligero incremento en el número de trozos de comida llevados a la boca con el miembro contralateral con respecto a la evaluación anterior. Además muestra una diferencia significativa con respecto al grupo sin tratamiento.

En la tercera evaluación del miembro contralateral a la lesión encontramos que el grupo Lesión mantiene su promedio de número de aciertos con respecto a su evaluación anterior, el grupo L-Dopa mantienen un promedio similar al grupo Lesión no encontrándose diferencias significativas en esta evaluación. Sin embargo el grupo tratado con Melatonina tiene un promedio mayor de aciertos con respecto a su evaluación anterior y con respecto a los otros dos grupos, observándose diferencias significativas.

Para la cuarta evaluación el número de ejecuciones acertadas realizadas con el miembro contralateral por parte del grupo lesión disminuyó más con respecto a su evaluación anterior a un promedio de 1.5 ± 0.5 . El promedio del grupo tratado con L-Dopa fue superior reflejando diferencias significativas con respecto al grupo lesión pero no diferente de la evaluación previa. El promedio del grupo tratado con Melatonina se mantuvo con un mejor desempeño, y se observan diferencias significativas con respecto a los otros dos grupos.

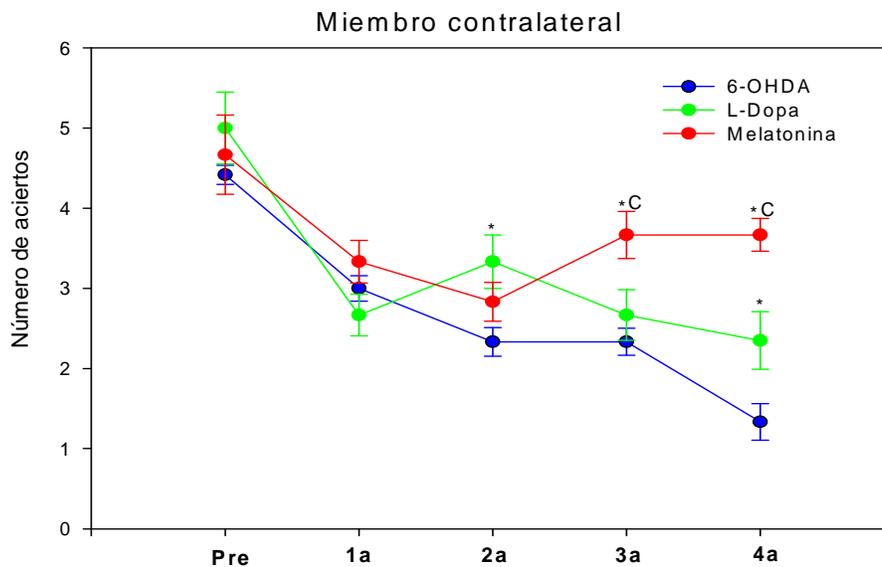
Aciertos con el miembro Ipsilateral: las evaluaciones para la ejecución del miembro ipsilateral a la lesión (Gráfica 4B) nos muestra un promedio de 5 ± 0.5 aciertos en la evaluación control al llevarse los trozos de comida a la boca en los tres grupos, registrándose disminución en el promedio en la primera y segunda evaluación, excepto el grupo tratado con L-DOPA que muestra un incremento para la segunda evaluación el cual es estadísticamente significativo con respecto a su evaluación anterior y con respecto a los otros dos grupos.

En la tercera evaluación se observa un decremento continuo en el número promedio de aciertos del grupo Lesión y el grupo tratado con L-Dopa para llevarse los trozos de comida a la boca con respecto a su evaluación anterior, mientras que el grupo tratado con Melatonina incrementa su desempeño siendo muy similar al del grupo L-Dopa, observándose así diferencias significativas de estos dos grupos con respecto al grupo Lesión.

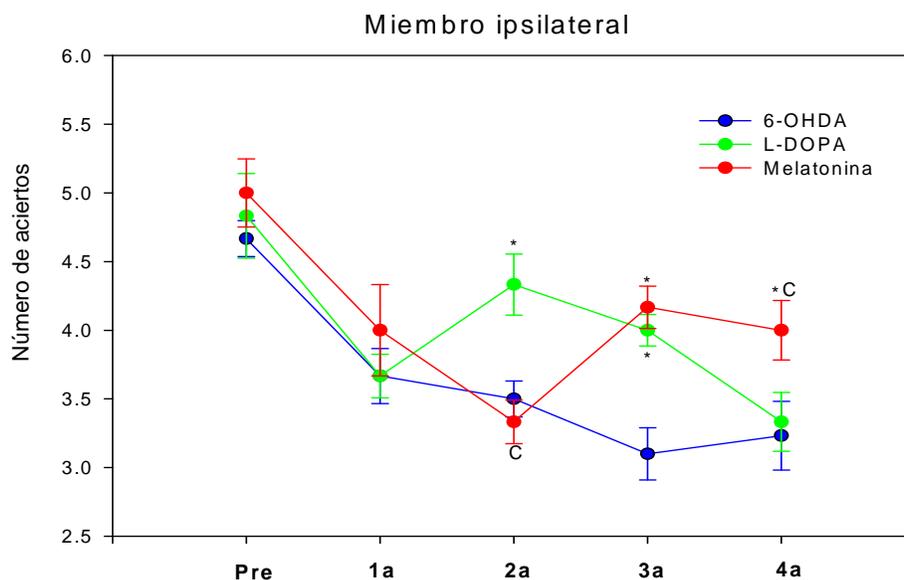
Para la cuarta evaluación se observa un decremento mayor en el número promedio de ejecuciones acertadas del grupo tratado con L-Dopa siendo similar al promedio registrado en el grupo Lesión, en estos dos grupos no se encuentran diferencias significativas. Por otra parte, el grupo Melatonina mantiene un mejor promedio de aciertos, por lo cual, se observan diferencias significativas con respecto a los otros dos grupos.

A

PRUEBA DE LA ESCALERA ACIERTOS



B



Gráfica 4. Número de aciertos registrado en cada evaluación para los tres grupos experimentales A) muestra el número promedio de aciertos ejecutados con la pata delantera contralateral a la lesión B) muestra el número promedio de aciertos ejecutados con la pata delantera contralateral a la lesión. Cabe destacar que hacia la tercera evaluación el grupo que recibió el tratamiento con Melatonina presenta recuperación en el desempeño de ambas extremidades, mientras que el grupo tratado con L-DOPA presenta un decremento en el número de aciertos con ambas extremidades con respecto a su evaluación anterior. * = $P < 0.05$ vs 6-OHDA, C= $P < 0.05$ vs L-DOPA.

Intentos en la prueba de la escalera: en la gráfica 5 podemos observar los promedios de intentos que realizaron las ratas para llevarse la comida a la boca con ambos miembros, cabe mencionar que el intento se definió como: hacer el movimiento de asir el trozo de comida y llevarlo a la boca pero sin haberlo tomado.

Intentos con el miembro contralateral: En la evaluación control se observa que en promedio el número de intentos fue 6 ± 0.1 en los tres grupos, no encontrándose diferencias significativas entre ellos.

Para la evaluación hecha a los 7 días podemos observar que el grupo tratado con L-Dopa (círculos verdes) tiene un incremento en el número de intentos con respecto a su evaluación anterior, y con respecto al grupo Lesión que tiene un decremento en su promedio. Sin embargo el grupo tratado con Melatonina mantiene el promedio de número de intentos con respecto a su evaluación anterior, observándose una diferencia significativa con respecto a los otros dos grupos.

El grupo lesión muestra una tendencia continua a disminuir el promedio de intentos realizados con la pata contralateral en las siguientes tres evaluaciones.

En la evaluación hecha a los 14 días el grupo tratado con Melatonina muestra un decremento importante con respecto a su evaluación anterior llegando a un promedio de 1 intento para llevarse los trozos de comida a la boca. Se observa una diferencia significativa con respecto al grupo sin tratamiento y al grupo L-Dopa el cual también tiene un ligero decremento en el número de intentos con respecto a su evaluación anterior. Además muestra una diferencia significativa con respecto al grupo Lesión.

Para la evaluación registrada a los 21 días los grupos tratados con Melatonina y L-Dopa tienen un promedio de 4 ± 2 intentos, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. Ambos grupos se presentan diferencias significativas con respecto al grupo Lesión.

En la evaluación realizada a los 28 días de tratamiento podemos observar que el grupo tratado con Melatonina tiene un incremento con respecto a su evaluación anterior en el número de intentos, el cual es estadísticamente significativo con respecto a los otros dos grupos que comparten un promedio en el número de intentos inferior a 2.

Intentos con el miembro ipsilateral: la evaluación del desempeño con el miembro ipsilateral en la prueba de la escalera, como lo muestra la gráfica 5B no se observan diferencias significativas entre los grupos, que tienen un promedio de 5.5 ± 0.3 intentos de llevar comida a su boca en la evaluación control.

En la primera evaluación correspondiente a los 7 días de tratamiento se observa un incremento en el número promedio de intentos de llevar los trozos de comida en los tres grupos, el grupo Lesión al igual que el grupo L-Dopa elevan su promedio hasta 9 ± 0.3 , no encontrándose diferencias significativas entre ellos. Por otra parte, el grupo tratado con Melatonina también incrementa su promedio con respecto a su evaluación anterior, pero dicho incremento, es menor al observado en los otros dos grupos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

La evaluación realizada a los 14 días nos deja ver que el grupo Lesión disminuyó el promedio de intentos de llevar comida a la boca con el miembro ipsilateral con respecto a su evaluación anterior, casi igualando el promedio de su evaluación control. Mientras que el grupo tratado con L-Dopa, mantiene su desempeño con respecto a su evaluación anterior. Por otra parte el grupo tratado con Melatonina no presenta diferencias evidentes con respecto a su evaluación anterior, pero hay diferencia estadísticamente significativa con respecto a los otros dos grupos.

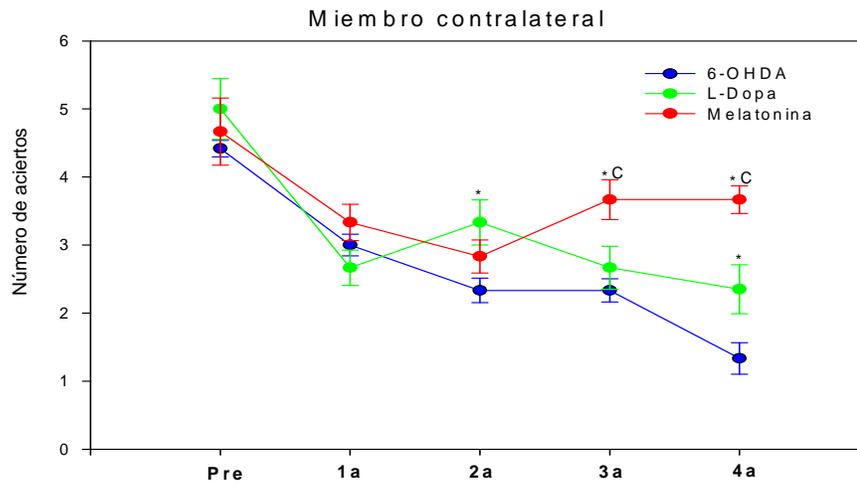
La tercera y cuarta evaluación prácticamente se mantienen igual a excepción del grupo Lesión que en la tercera evaluación sube ligeramente su promedio de intentos con respecto a la evaluación previa, para luego disminuirla en la cuarta evaluación. Los otros dos grupos mantienen sus promedios y sus diferencias significativas.

A

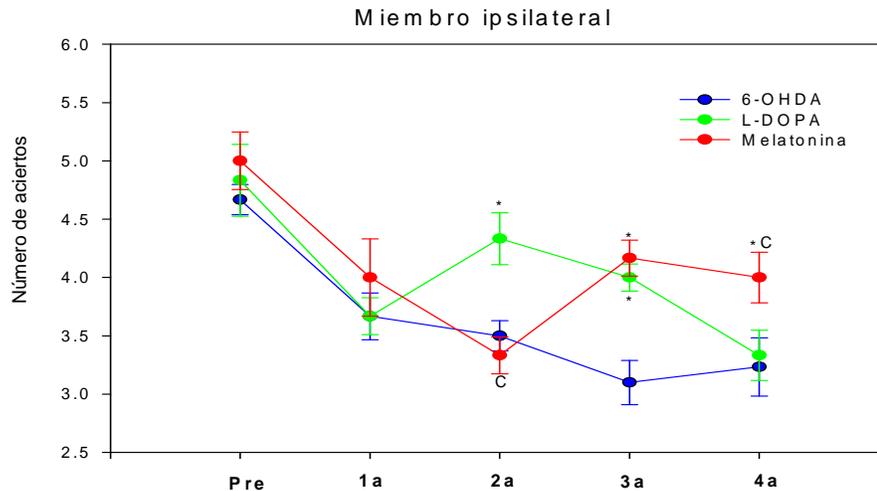
B

PRUEBA DE LA ESCALERA ACIERTOS

5



Gráfica



Promedio de los intentos por llevarse la comida a la boca por parte de los animales de cada uno de los tres grupos A) intentos realizados con el miembro contralateral, B) intentos con el miembro ipsilateral. Grupo Lesión representado por círculos azules, Grupo L-Dopa representado por círculos verdes y Grupo Melatonina círculos rojos. * = $P < 0.05$ vs 6-OHDA, C = $P < 0.05$ vs L-DOPA.

DISCUSIÓN

Muchas pruebas motoras para roedores han sido basadas en descripciones de la conducta en campo abierto, o sobre la coordinación y balance: tales como la viga rotatoria y elevada. Sin embargo, observaciones en ratas y ratones confirman que las pruebas que exigen a los animales alcanzar piezas de comida para alimentarse son consideradas útiles pues arrojan datos precisos sobre la capacidad de ejecución de cada pata.

Whishaw (1997) reporta que en animales con lesión unilateral la falta de DA afecta de tal manera las extremidades contralaterales que el animal no puede realizar cambios posturales, y presenta dificultad para manipular su muñeca y dígitos para realizar movimientos finos; si llega a realizar estos movimientos lo hace con torpeza y lentitud, y debe de valerse de estrategias compensatorias que involucran el lado no lesionado para lograr el objetivo del movimiento.

Se ha desarrollado una variedad de pruebas para el estudio del desempeño motor en ratas basadas en la privación de alimentos, diseñando aparatos que obliguen a los animales a hacer explícitos los movimientos de alcance y agarre, para escoger y recoger los pedazos de comida. Una de esas pruebas es la de la escalera diseñada para ratas en 1990 por Montoya y colaboradores. Y ha sido subsecuentemente empleada para detectar lesiones unilaterales en Corteza Motora, cuerpo Estriado, Sustancia Negra, Núcleo Subtalámico, Núcleo Pedúnculo pontino, así como para evaluar los efectos restaurativos de tratamientos de neuroprotección o trasplante de células (Fernández-Espejo 2003).

La prueba de la escalera es un tipo de evaluación conductual que se emplea para medir el déficit motor presente en las extremidades anteriores de ratas con lesión unilateral de la vía nigroestriatal. Esta prueba nos permite medir de manera

independiente y cuantificable el uso de ambas extremidades anteriores para recolectar alimentos y llevarlos a la boca.

A diferencia de las pruebas que exploran las rotaciones inducidas por agonistas dopaminérgicos, las cuales monitorizan conductas motoras simples y estereotipadas, que se producen por la estimulación masiva de los receptores dopaminérgicos. La prueba de la escalera involucra en la exploración una secuencia de movimientos realmente compleja, que deben coordinarse muy bien para culminar en una conducta exitosa, la detección del alimento, su agarre, manipulación para tomarlo y llevarlo a la boca sin que se caiga (Galván, 2000).

Aun cuando en la prueba de la escalera el mayor grado de afectación se detecta en la pata delantera contralateral a la depleción dopaminérgica, la lesión unilateral de la SNc tiene un efecto moderado sobre la extremidad ipsilateral, la deficiencia motora en esta extremidad puede indicar un defecto motor bilateral, consecuencia de un déficit dopaminérgico unilateral. Este defecto puede ser la expresión de la necesidad de que las conductas de coordinación sensoriomotora complejas, como lo son las evaluadas en esta prueba, se integren en los circuitos de ambos hemisferios.

Desempeño del grupo lesión (inyección unilateral de 6-OHDA en el haz medial):

Resulta evidente que la inyección unilateral de 6-OHDA en el haz medial es capaz de alterar el desempeño motor de los animales en las diferentes pruebas empleadas en este experimento. Como ya se mencionó la 6-OHDA es la neurotoxina mas ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de EP en roedores. La inyección intracerebral de 6-OHDA produce la destrucción selectiva de neuronas catecolaminérgicas, esta especificidad se debe a la alta afinidad de esta neurotoxina por el sistema de transporte de catecolaminas. Ungerstedt en 1968 describió por primera vez que la inyección

estereotaxica de 6-OHDA en el haz nigroestriatal induce una lesión selectiva de las neuronas DA de la SNc.

Resulta relativamente sencillo explicar el pobre desempeño mostrado en las diversas pruebas por los animales pertenecientes al grupo que fue lesionado unilateralmente con 6-OHDA (grupo lesión) pero que no recibió tratamiento farmacológico posterior, pues su estado de afectación es comparable al de personas con la EP en estadios avanzados de dicha enfermedad.

Incluso si observamos con detenimiento podemos apreciar que en el transcurso de las evaluaciones en la prueba de la viga cada vez tardaban mas tiempo en cubrir el recorrido (incluso en las vigas de mayor grosor), aparentemente la habilidad motora necesaria para realizar esta prueba se iba deteriorando. En el caso de la prueba de campo abierto se hace evidente que con el transcurso del tiempo los animales de este grupo lesionado tendían a disminuir su actividad normal, es decir presentaban acinesia; se movían menos y realizaban menos veces actividades motoras relacionadas con la exploración cuando se localizan en campo abierto (desplazarse y erguirse).

Con respecto a la habilidad motora fina para asir alimentos (prueba de la escalera) se observa que con el paso del tiempo también se afecta el desempeño de ambas patas. En general este grupo de animales cada vez tienen mayor dificultad para realizar las pruebas motoras. Se sabe que al hacer la inyección de la neurotoxina 6-OHDA esta ingresa a las células a través del transportador para DA pero también se ha demostrado que existe una curva temporal de muerte neuronal inducida por la 6-OHDA, de tal forma que se ha propuesto que el efecto total de la toxina se observa hasta uno o dos meses después de la lesión (Przedbroski *et al.*, 1995; Blandini *et al.*, 2007).

Desempeño del grupo tratado con L-DOPA

La L-DOPA sigue siendo la primera opción en el tratamiento sintomático de la EP, aunque sus efectos adversos dificultan su utilización crónica (García, 1999).

Varios autores han señalado la importancia del tratamiento de la L-DOPA en la EP, a lo que han apuntado que su introducción como tratamiento ha sido exitosa durante los primeros años para contrarrestar los síntomas, sobre todo las alteraciones conductuales. Cotizas y cols. (1967) reporta que la administración oral de L-DOPA provoca efectos benéficos sostenidos y dramáticos en pacientes con EP, posteriormente se establece que produce efectos anti-rigidez.

Nuestros datos con respecto al grupo de animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA y tratados con L-DOPA muestran que en las primeras evaluaciones después del inicio del tratamiento, los animales presentaron mejor desempeño en prácticamente todas las pruebas de habilidad motora, en la prueba de la viga hasta la evaluación realizada a los 21 días de tratamiento fueron el grupo que tardó menos tiempo en recorrer cada viga independientemente del grosor, pero en la última evaluación (28 días) se incrementó notoriamente el tiempo que emplearon para cruzar cada viga.

En la prueba de conducta libre en campo abierto se advierte que los animales de este grupo presentaban mayor dinamismo en cada una de las actividades registradas durante las primeras tres evaluaciones, pero hacia la última evaluación disminuyó la actividad llegando a niveles similares a los presentados por los animales lesionados que no recibieron ningún tratamiento.

Respecto al desempeño motor fino, evaluado a través de la prueba de la escalera, se percibe que independientemente del miembro evaluado (ipsilateral o contralateral) el número de aciertos disminuye a partir de la segunda evaluación, es decir a los 14 días postratamiento.

Cabe resaltar que al comparar las pruebas que miden el desempeño motor grueso (viga y campo abierto) con la prueba que evalúa el desempeño motor fino, no hay

una correspondencia en la temporalidad del efecto de la L-DOPA, es decir en las dos primeras pruebas el desempeño se ve mermado hacia los 28 días de tratamiento mientras que en la prueba de la escalera tal merma es significativa a partir de los 14 días de tratamiento, a este respecto podemos suponer que tal diferencia se debe al grado de compromiso motor que implica cada una de las pruebas. Ya que como se señaló previamente la prueba de la escalera obliga a los animales a hacer explícitos los movimientos de alcance y agarre, para escoger y recoger los pedazos de comida midiendo de manera independiente cada uno de los miembros (Montoya *et al.*, 1990).

Nuestros resultados concuerdan con la información existente que señala que desafortunadamente la L-DOPA tiene efectos transitorios (Tolosa *et al.*, 1998); este fármaco revierte algunos de los déficits motores de la enfermedad de Parkinson, a través de su conversión a DA, sin embargo pierde eficacia cuando se administra a largo plazo (Obeso, 1995; Wolters *et al.*, 1995). En nuestro caso pudimos detectar cómo el efecto benéfico de la L-DOPA fue cada vez menos efectivo. Se sabe que en el metabolismo de la L-Dopa a DA se generan radicales libres por medio de la MAO-B (enzima que participa en el metabolismo), por lo que se ha sugerido que la pérdida neuronal después de la ingesta de la L-DOPA puede ser a causa de mecanismos de oxidación, existe una amplia evidencia de que la L-DOPA y la DA reducen la supervivencia de las células dopaminérgicas en cultivo (Luo y Roth, 2000). Asimismo se ha reportado que la administración a largo plazo puede acelerar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (por incremento en la producción de radicales libres, Jenner, 1995; Wolters *et al.*, 1995).

Apoyando esta idea, datos previos de nuestro laboratorio han reportado que después del tratamiento con un agonista dopaminérgico que tiene propiedades antioxidantes, las alteraciones ultraestructurales inducidas por la inyección de 6-OHDA y exacerbadas por el tratamiento con L-Dopa se disminuyen; llegando en

algunos parámetros a presentar características similares a las de los animales control (Ordoñez, 2004; Avila-Costa *et al.*, 2005).

Desempeño del grupo tratado con Melatonina:

Como se señaló previamente se decidió formar un grupo de animales lesionados a los que se les administró Melatonina, una sustancia a la que se le han atribuido importantes propiedades antioxidantes (Reiter *et al.*, 2003; Piñol *et al.*, 2006; Kundurovic y Sofic, 2006). Encontramos que este grupo de animales presentó un pobre desempeño desde el inicio del tratamiento en cada una de las pruebas, pero con el paso del tiempo, hacia las evaluaciones hechas a los 21 y 28 días, mostraron una notable mejoría en la realización de todas las pruebas, llegando incluso a tener un desempeño similar al mostrado en la evaluación control.

Se sabe que las deficiencias que muestran los animales inyectados unilateralmente con la neurotoxina 6-OHDA se debe a que este fármaco depleta la inervación dopaminérgica pues induce la muerte neuronal en la SNc. Y como mostraron Hefti y colaboradores (1980) hay una estrecha relación entre los contenidos de DA, el número de giros inducidos por apomorfina y el número de neuronas remanentes, con esto podemos decir que en un principio los animales tuvieron una amplia disminución de la inervación dopaminérgica que se hizo evidente por lo estricto del requisito para poder emplearlos como animales experimentales (mínimo de 200 giros en 30 minutos inducido por apomorfina), y que se siguió observando en las primeras semanas postratamiento (hasta los 14 días aprox.). Cabe recordar que se ha propuesto que el efecto total de la 6-OHDA se observa hasta uno o dos meses después de la lesión (Przedbroski *et al.*, 1995; Blandini *et al.*, 2007), y que hay reportes que muestran que la inyección de la neurotoxina es sumamente agresiva y provoca que algunas células dejen de ser funcionales (es decir, dejan de producir DA) sin necesariamente inducir su muerte (Kearns y Gash, 1995).

Los animales tratados con Melatonina probablemente no mejoraron la conducta motora al inicio del tratamiento debido a que presentan un desbalance motor similar al grupo de 6-OHDA, entonces es factible pensar que con el tratamiento con Melatonina después de un tiempo la célula recupera su actividad, produciendo DA y remodulando la influencia sobre los núcleos blanco reflejándose en la recuperación de la actividad motora.

En concordancia Aguilar (2002) reporta que ratas lesionadas con la inyección de 6-OHDA en el estriado a las cuales se les administra Melatonina a bajas dosis (2 y 5 mg/kg, i.p.), después de una hora a partir de la lesión y siete días después de la lesión, el decremento de DA estriatal es de solo el 48 y 38% respectivamente. Mientras que las ratas lesionadas con 6-OHDA (grupo control) el decremento de DA en el estriado ipsilateral fue de un 83% comparado con el lado contralateral. Con respecto a nuestros resultados nosotros utilizamos una dosis de 10 mg/Kg no obstante percibimos mejoría en relación a la actividad motora tanto fina como gruesa.

Recientemente se ha encontrado que la melatonina posee propiedades antioxidantes como barredora de radicales libres. Experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que puede proteger a las células, tejidos y otros órganos contra el daño oxidativo inducido por una variedad de procesos y agentes que generan radicales libres (Aguilar, 2002). Al parecer esta propiedad es lo que permite disminuir el daño citotóxico, pues la 6-OHDA provoca la acumulación de H_2O_2 y el $OH\bullet$ (León, 1996).

A favor de la idea de que la cantidad de DA remanente en el estriado lesionado tiene una clara influencia sobre el desempeño motor tenemos que Blanco (2000) realizando estudios donde microtransplantaba células mesencefálicas fetales en estriado y observa su efecto benéfico sobre el giro inducida por sustancias dopaminérgicas, así como sobre la habilidad en la utilización de las extremidades delanteras para tomar trozos de comida, en ratas lesionadas previamente con 6-

OHDA. Pavón (1998b) también realiza trasplantes de tejido mesencefálico fetal rico en neuronas dopaminérgicas dentro del estriado denervado de DA y puede restaurar los niveles de neurotransmisión dopaminérgica y producir beneficio en la sintomatología. Este efecto benéfico inducido por la implantación de tejido catecolaminérgico se ha observado tanto en los pacientes como en los modelos experimentales de la enfermedad (Otero, 1996).

En resumen la Melatonina ayudó a la recuperación del desempeño motor en ratas lesionadas con 6-OHDA, dicha recuperación se manifestó de forma significativa en la recuperación de las habilidades motoras en los grupos tratados, probablemente debido a sus vastas propiedades antioxidantes. Propiedades que probablemente estén ayudando a sobrevivir a las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Así, se puede considerar a la Melatonina como alternativa de tratamiento para contrarrestar, o al menos disminuir, las alteraciones motoras características de la EP.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos después de la aplicación de las tres diferentes pruebas y con los dos tratamientos, podemos decir que:

La inyección unilateral de 6-OHDA en el haz medial altera el desempeño motor de los animales en pruebas de coordinación motora fina y gruesa, afectando ambos miembros (ipsi y contralateral a la lesión).

El tratamiento con L-DOPA, en animales con la inyección unilateral de 6-OHDA en el haz medial, induce mejoras en el desempeño motor de estos animales, pero solo durante un periodo corto pues a partir de los 21 días postratamiento el desempeño se torna cada vez mas deficiente.

El tratamiento con Melatonina en animales con la inyección unilateral de 6-OHDA en el haz medial es capaz de inducir mejoras en el desempeño motor, pero solo a largo plazo pues las mejoras son evidentes en ambos miembros delanteros solo a partir de los 21 días postratamiento.

ANEXO

Abreviaturas

6-OHDA	6-hidroxidopamina
DA	Dopamina
EP	Enfermedad de Parkinson
EN	Enfermedades Neurodegenerativas
EH	Enfermedad de Huntington
H ₂ O ₂	Peroxido de Hidrogeno
MAO	Mono Amino Oxidasa
Melatonina	N-acetil-5-Metoxitriptamina
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
OH-	Radical Hidroxilo
RL	Radicales libres
SNc	Sustancia Negra compacta
GSH	Glutation Peroxidasa
L-Dopa	Levo-dihidroxifenilalanina
ROS	Especies Reactivas de Oxigeno
MPTP	1-Metil-4, Fenil-1,2,3-6-Tetrahidropiridina
i.p.	Intra peritoneal

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aguilar LMV, Vazconcelos SMM, Sousa FCF, Viana GSB. (2002) Melatonin reverses neurochemical alterations induced by 6-OHDA in rat striatum. *Life Sciences*. (70):1041-1051

Alanis QM. (1996). Historia natural de la Enfermedad de Parkinson. En -Otero-Siliceo. 1996. Parkinson enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México.11-17

Arpa Gutierrez. J. Vivancos Matellanos F. (2004) Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson Información Terapeutica del Sistema Nacional de Salud. Vol 28–Nº 3 pp. 57-69

Asociación de Corea de Huntington Española (ACHE) (2002). Enfermedad de Huntington: Un camino a la esperanza, *Suma Neurológica* Vol. 1 No. 2

Avila Costa MR, Colín BL, Espinosa VJ, Machado SJ. (1998). Degeneración del neurópilo del núcleo caudado en la enfermedad de Parkinson y en el modelo experimental provocado con 6-OHDA: Análisis ultraestructural comparativo. *Patología*. México. 36:297-301

Avila Costa MR, Colín BL, Aley P, Espinosa VJ, Gutierrez A, Librado JL, Montiel E, Fortoul T. (2005). Bilateral increase of perforated synapses after unilateral dopamine depletion. *Int J Neurosci*. 115(1):79-86.

Balbuena Aguirre ME, Berecoechea MC, Brest CF, Ramírez Candia OA, Alcaraz PR. (2005). Comparación entre la levodopa y los agonistas dopaminérgicos para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina – No. 143*. Pp. 13-17

Blanco N, Pavón R, Macias L, Castillo C, Díaz A, García P, Álvarez. (2000) microtransplante simultaneo de células mesencefálicas fetales en estriado y sustancia nigra pars reticulada de ratas hemiparkinsonianas. *Estudio conductual. Revneurol* 30 (12) p.p. 1112-1127

Blandini (2007) Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rats: new clues from an old model. *Eur J Neurosci*. Jan;25(2): 397-405

Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. (1967) Aromatic aminoacids and modification of Parkinson. *New Eng. J. Med*. 276: 374-379

Costa Ribas C, Castiñeira Pérez C. (2001) Enfermedad de Parkinson. Guías Clínicas de Atención Primaria. Pp.1- 16

Cubero JJ. (2003) Triptófano, melatonina y ritmos de actividad/inactividad en animales diurnos y niños lactantes. Fagocitosis y metabolismo oxidativo. Tesis Doctoral.

Dorado MC, Rugerio VC, Rivas Arancibia S. (2003) Estrés Oxidativo y Neurodegeneración. Rev Fac Med, UNAM Vol.46 No.6 Pp. 228-235

Fernández-Espejo E., El Banoua F, I. Caraballo, B. Galán,. Flores J.A (2003). Trasplante de células naturales 'dopaminotróficas':nuevo concepto terapéutico antiparkinsoniano . Rev neurol, 36 (6): 540-544

García M-Escrig, Bermejo-Pareja, F. (1999) complicaciones motoras del tratamiento con Levodopa en la Enfermedad de Parkinson. Revneurol 28: 799-809

García-Martínez JC. (2003) La enfermedad de Parkinson vista por un afectado Rev. Neurol. 7(4):391-400

Galván Zamudio A. (2000) Papel de la inervación dopaminérgica al Globo Pálido en la actividad motora de la rata. Tesis Doctoral, Dpto Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV-IPN.

Grau-Veciana JM. (2006) Tratamiento de los síntomas no cognitivos de la Enfermedad de Alzheimer. Rev. Neurol 42(8) Pp. 282-288

Gilman Winans NS. (1994) Principios de neuroanatomía y neurofisiología clínica de Monter y Gats. El manual moderno S.A. de C.V. (3 ed.). Méx. D.F. p.183-192

González N. (2004) Potenciales evocados multimodales en pacientes con Esclerosis lateral Amiotrofica. Rev Med. IMSS; 42 (6): 477-486

González-Fraguela ME, Castellano-Benítez O, González Hoyuela M. (1999) Estrés oxidativo en las neurodegeneraciones. Rev. Neurol,504-511

Gutiérrez VA. (2004). Efecto de la L-DOPA en el estriado y Sustancia nigra de rata lesionada con 6-OHDA: Modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el grado de Biólogo. ENEP-Iztacala UNAM.

Gutiérrez VA. (2007). Comparación del efecto de diferentes fármacos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. ENEP-Iztacala UNAM.

Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ. (1980) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res.*, 195(1):123-137

Hilber P., Lalonde R., J. Caston (1999) An unsteady platform test for measuring static equilibrium in mice. *Journal of Neuroscience Methods* 88: 201–205

Hoénicka J. (2002) Aspectos genéticos de la Enfermedad de Parkinson. *Suma Neurológica* Vol. 1(1):20-24

Hornykiewicz O. (1962) Dopamine (3-hydroxytyramine) in the central nervous system and its relation to the Parkinson syndrome in man. *Dtsch Med Wochenschr.* Sep 7;87:1807-10

Hornykiewicz O. (1966) Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev.* Jun;18(2):925-64.

Jenner P. (1995) The rationale for the use, of dopaminergic agonists in Parkinson's disease. *Neurology* 45 (Suppl 3): S6-S12

Jiménez del Río M., Velez-Pardo C. (2001) La apoptosis en las Enfermedades Neurodegenerativas: Evidencias y Controversias. *Rev. Neurol.* Pp. 851-860

Joyce N.J. (1993) Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine III. Results in Parkinson's disease case. *Brain Research.* 600: 156-160

Kearns MC, Gash MD. (1995). GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. *Brain Research* 672. 104-111

Kundurovic Z, Sofic E. (2006). The Effects of Exogenous Melatonin on the Morphology of Thyrocytes in Pinealectomized and Irradiated Rats. In: Eds. S.R. Pandi-Perumal, D.P. Cardinali .*Melatonin: From Molecules to Therapy.* Nova Science Publishers, Inc.

Langston JW, Forno LS, Robert CS, Irwin I. (1984) Selective nigral toxicity after systemic administration of MPTP in the squirrel monkey. *Brain Res.* 292: 390-394

L.J. Ramírez-Jirano a, J.L. Ruiz-Sandoval b, F.J. Jiménez-Gil c, J. Ramírez-Vega d, E. Vargas-Frutos a, M.P. Gallegos-Arreola. (2007). Frecuencia del polimorfismo IVS4+66A-G en el gen *alfa-sinucleína* en pacientes con enfermedad de Parkinson del noroccidente de México. *Rev Neurol* 44 (1): 15-17

Larumbe R. (1995) *Estés Oxidativo y Enfermedad de Parkinson.* Departamento de Salud. Gobierno de Navarra

Larumbe R, Gaminde I, Viñes JJ. (1999) Aspectos clínicos y demográficos de la enfermedad de Parkinson. Servicio de Docencia, Investigación y Desarrollo Sanitarios. Departamento de Salud. Gobierno de Navarra.

León FLI. (1996) Etiología de la enfermedad de Parkinson. En Otero-Silíceo. Parkinson, enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México D.F. p 25-34

Li S.C., Schoenberg B.S., Wang C.C., Cheng X.M., Rui D.Y., Bolis C.L. (1985) A prevalence survey of Parkinson's disease and other movement disorders in the people's Republic of China. Arch. Neurol; 42: 655-657.

Litvan I. (1999) Nuevas perspectivas en la Enfermedad de Parkinson. Rev Neurol. Pp. 139-145

Luo Y, Roth G. (2000) The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptors signaling in aging and age-related neurodegeneration. Antioxidants and redox signaling. 2(3): 449-460

Luquin MR. (1994) Modelos Experimentales de la enfermedad de Parkinson, Unidad de Neurología Experimental. Departamento de Neurología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona. España

Luquin MR, Saldise L. (1997). Sistema dopaminérgico y muerte neuronal. Rev Neurol; 25:S129-40

Machado Ferro M, Bellísimo MI, Anselmo-Franci J, Mendes M, Sabino N, Da Cunha C. (2005) Comparison of bilaterally 6-OHDA and MPTP lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. Journal de Neuroscience Methods 148, pp 78-87

Metz GA, Farr T, Ballermann M, Whishaw IQ. (2001) Chronic levodopa therapy does not improve skilled reach accuracy or reach range on a pasta matrix reaching task in 6-OHDA dopamine-depleted (hemi-Parkinson analogue) rats. Eur J Neurosci. Jul;14(1):27-37

Miklyaeva EI, Castaneda E, Whishaw IQ. (1994). Skilled reaching deficits in unilateral dopamine-depleted rats: impairments in movement and posture and compensatory adjustments. J Neurosci 14: 7148-58

Miklyaeva EI, Whishaw IQ. (1996) Hemiparkinson analogue rats display active support in good limbs versus passive support in bad limbs on a skilled reaching task of variable height. Behav Neurosci, 110 (1), 117-25

Molina JA, Jimenez-Jimenez FJ, Ortí-Pareja. (1999). Complicaciones motoras y psíquicas en el tratamiento prolongado con levodopa de la enfermedad de parkinson complicada. Rev. Neurol. 28(10): 982-990

Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. (2005). Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Advance on January 25*:57-87

Montoya CP, Astell S, Dunnett SB (1990) Effects of nigral and striatal grafts on skilled forelimb use in the rat. *Prog. Brain Res.* 82: 459-466

Muthane UB, Swamy HS, Satishchandra P, Subbhast MN, Raos S, Swbakvishua D. (1994) Early onset Parkinson's disease: are juvenile and young-onset different? *Mov Disord.* 9: 539-544.

Murray HE, Pillai AV, McArthur S, Rrazvi N, Datla KP, Dexter DT, Gilles GE (2003) Dose-and sex-dependent effects of the neurotoxin 6 hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females. *Neuroscience* 116: 213–222

Nam Eunjoo., Min Lee, Seung, Eun Koh, Seong., Seok Joo, Wan., Maeng Sungho., In Im Heh, Sik Kim Yong. (2005). Melatonin protects against neuronal damage induced by 3-nitropropionic acid in rat striatum. *Brain Research* 1046; 90-96

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Zamarbide I.(1995) Enfermedades Neurodegenerativas. Cap. 6 Clínica Universitaria y Facultad de Medicina.

Ordóñez-Librado JL. (2004). Comparación del efecto de la taurina y la bromocriptina en la ultraestructura del núcleo caudado de rata después de la lesión unilateral con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Tesis para obtener el grado de Biólogo. ENEP-Iztacala .UNAM.

Otero-Silíceo (1996) Parkinson, enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México D.F. p 25-34

Parkinson's Disease Foundation (2001) Parkinson's Disease A Guide for Patients. 4^a Edt. Pp. 1-39

Pavón N, Vidal L, Blanco L, Álvarez-Fonseca P, Torres-Montoya A, Lorigados L, Álvarez-González L, Macías R. (1998) Factores que desencadenan la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol*; 26: 554-60

Pavón N, Vidal L, Álvarez P, Blanco L, Torres A, Rodríguez A, Macías R. (1998b). Evaluación conductual del modelo de lesión unilateral en ratas con 6-hidroxidopamina. Correlación entre las rotaciones inducidas por D-anfetamina, apomorfina y la prueba de habilidades manuales. *Rev Neurol*; 26: 915-8

Paxinos G, Watson C. (1986). The rat brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edn. Academic Press, New York.

Piñol-Ripoll G, Fuentes-Broto L, Millán-Plano S, Reyes-González M, Mauri JA, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, García JJ. (2006). Protective effect of melatonin and pinoline on nitric oxide-induced lipid and protein peroxidation in rat brain homogenates. *Neuroscience Letters* 405: 89–93

Polimeropoulos M.H., Lavedan, C. Leroy, E. Ide, S.E. Dehejia A. (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 274:1197-1199.

Przedbroski S, Leviver M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. (1995) Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neurosciences*, 67(3): 631-647

Radad Khaled, Gille Gabriele, Rausch Wolf –Dieter (2005) Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to Parkinson's Disease. *Pharmacological Reports*. Pp. 701-712

Ramaker C, Van de Beeck JTW, Finken JJM, Van Hilten JJB. (2000) The efficacy and safety of adjunct Bromocriptine therapy for levodopa-induced motor complications: A systemic review. *Movement Disorders*. 15 (1): 54-64

Reiter RJ, Tan D, Mayo JC, Sainz RM, León J, Czarnocki Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implications in human. *Acta biochemica Polonica*. 50 (4): 1129-1146

Rios de Molina MC (2003) El estrés oxidativo y el destino celular. *Química viva*. Volumen 2, Número 1

Rufo-Campos M. (2002) Melatonina y epilepsia. *Revneurolog* 35 (supl 1): 51-58

Samsam, Tracey E., Gadrinab, Louis G., Bushnell, Philip J. (2004) Toxicological evaluation of the staircase test for assessing fine motor movements. *Neurotoxicology and Teratology* 26. PP113–120

Schultz, W. (1998). Predictive Reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*. 1-27

Schwartzing RK, Huston JP. (1999) the unilateral 6-Hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*. 50(2-3) 275-331

Segura T, Galindo MF, Rallo-Gutiérrez B, Ceña V, Jordán J. (2003) Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. Revisión en neurociencias; Editor JV Sánchez-Andrés. *Revneurolog*; 36 (11): 1047-1057

Tapia-Núñez J. (2004) Diagnostico de la enfermedad de Parkinson. Rev. Neurol :57-61

Tolosa E, Martí MJ, Valldeorila F, Molinuevo JL. (1998) History of levodopa and dopamine agonists in Parkinson's disease treatment. Neurology. 50(suppl 6): S2-S10

Ungerstedt U. (1968) 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoaminergic neurons. Eur. J. Pharmacol. 5: 107-110

Ungerstedt U. (1971a). Dipsia and Aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. Acta Physiol. Scand. Sup. 367: 95-121

Ungerstedt U. (1971b). Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed birotational behavior. Acta Physiol. Scand. Sup 367: 49-93

Velasco F. (1986) Enfermedad de Parkinson. Arch. Invest. Med. Mexico, 10:108-117.

Venero J, Absi AL, El-Hadi, Cano J, Machado A. (2002). Melatonin induces tyrosine hydroxylase mRNA expression in the ventral mesencephalon but not in the hypothalamus. J Pineal Res. 32:6-14

Whishaw IQ, Woodward NC, Miklyaeva E, Pellis SM. (1997) Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. Behav Brain Res Dec;89(1-2):167-77

Wolters CHE, Tissingh G, Bergsmans LM, Kuiper M. (1995) Dopamine agonists in Parkinson's disease. Neurology (Suppl 3): S28-S34

Winn P. (1991) Excitotoxins as tools for producing brain lesions. En Conn, P.M. (Comp) Lesion and transplants. Methods in Neurosciences vol 7 Academic Press inc.

Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Striker EM. (1990) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic aplicatios. Trends Neurosci 13(7): 290-296