



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE PSICOLOGÍA

**EFFECTOS CONDUCTUALES DE LA ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRA-
NEAL EN RATAS CON HEMIPARKINSONISMO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA:

JUAN CARLOS ESCOTTO RAMÍREZ

DIRECTOR: DR. VÍCTOR MANUEL MAGDALENO MADRIGAL

DIRECTOR ADJUNTO: DR. ALEJANDRO VALDÉS CRUZ

ASESOR: DRA. LILIA MESTAS HERNÁNDEZ



Ciudad de México

Agosto, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice

Agradecimientos	1
Abreviaturas	2
Resumen	4
Introducción	6
Zonas cerebrales relacionadas	11
Tratamientos	14
Modelos animales	18
Planteamiento del problema	22
Pregunta	23
Hipótesis	23
Objetivo	23
Objetivos específicos	23
Método	24
<i>Material</i>	24
<i>Manejo de animales</i>	25
or! Marcador no definido.	
<i>Lesión con 6-OHDA</i>	26
<i>Pruebas conductuales</i>	26
<i>Prueba del cilindro</i>	26
<i>Rotarod</i>	27
<i>Campo abierto</i>	27
<i>Estimulación Magnética Transcraneal</i>	28
<i>Análisis estadísticos</i>	29
Resultados	30
1) <i>Prueba del cilindro</i>	30
2) <i>Campo abierto</i>	33
3) <i>Prueba de rotarod</i>	36
Discusión	39
Conclusiones	42

Fig. 4. Línea del tiempo que muestra el procedimiento experimental seguido a lo largo del experimento.

¡Err

Agradecimientos

A mi madre: ni todos los libros del mundo podrían brindarme el conocimiento que una de tus palabras me da. Gracias por ser aliento y fuerza cuando lo necesito.

A Sofía: tu amor es la más grande fuente de motivación de la cual me serví para terminar este proyecto. No faltes en mi vida nunca. Te amo.

A mi papá Alejandro Escotto: por ser padre y amigo. Gracias por compartir conocimiento y cariño conmigo.

A mi papá Alejandro Hernández: por el cálido y desinteresado amor; por ser ejemplo de perseverancia y dedicación.

A mi familia: me subí en hombros de gigantes para alcanzar mis sueños. Los quiero.

Al Dr. Víctor Magdaleno: por mostrarme la luz de la ciencia, la investigación y la paciencia. Estaré eternamente agradecido con usted.

A mis amigos: lo mejor que me dejó la licenciatura fueron ustedes. Que nunca falten las risas y los éxitos compartidos. Los quiero.

A Gerardo y Josué: por apoyarme limpiando ratas, aguantando mordidas y haciéndome reír en la monotonía del laboratorio.

A los olvidados que son muchos para recordarlos

Abreviaturas

ATP	Adenosina-5-trifosfato
Amíg	Amígdala
M1	Área Mоторo primaria
VTA	Área Ventral Tegmental
BDNF	Brain-derived Neurotrophic
CPFL	Corteza Prefrontal Dorso-Lateral
DBS	Deep Brain Stimulation
L-DOPA	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
DA	Dopamina
EP	Enfermedad Parkinson
EMTr	Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
GB	Ganglios Basales
GP	Globo Pálido
GPe	Globo Pálido externo
GPi	Globo Pálido interno
6-OHDA	6-Hidroxidopamina (2,3,5 trihidroxifeniletilamina)
LTD	Long term depression
LTP	Long Term Potentiation
MFB	Medial Forebrain Bundle
MPDP+	1-Metil-4-fenil 2,3, dihidropiridínico
MPTP	1-Metil-4-Fenil-2, 3,6-tetrahidroxipiridina
MAO	Monoamina oxidasa
NAcc	Núcleo Acúmbeo
ND	Neuronas dopaminérgicas
NEM	Neuronas Espinosas Medianas
NEMd	Neuronas Espinosas Medianas de vía directa
NEMi	Neuronas Espinosas Medianas de vía indirecta
NST	Núcleo subtalámico

MPP+	Peptidasa de procesamiento mitocondrial
RVD	Receptores de Vitamina D
SNC	Sistema Nervioso Central
SNpc	Substancia nigra pars compacta
SNr	Substancia nigra pars reticulata
TH	Tirosina Hidroxilasa
DAT	Transportadores de Dopamina
OTub	Tubérculo olfatorio

Resumen

La Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva (EMTr) es una estrategia terapéutica utilizada a principios de los 80' no invasiva para el tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas resistentes al tratamiento farmacológico. Los mecanismos de acción aún no se determinan con claridad, y su empleo cada vez es más común. La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que afecta la actividad motora y cognitiva debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas asociadas al movimiento. La lesión neurotóxica del haz presencefálico medial (HPM) con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es selectiva a células dopaminérgicas y mimetiza los signos correspondientes a la EP en roedores. El objetivo del presente estudio fue analizar los cambios motores de la EMTr en ratas con hemiparkinsonismo. Se utilizaron 12 ratas macho Wistar de 7 meses de edad con ingesta de alimento controlado. Se hizo una lesión unilateral con 6-OHDA (4 μ g/0.6 ml ácido ascórbico; 0.5 μ l/1 min) en el HPM (AP -1.6 mm; LM + 1.5 mm; DV -7.6 mm).

El registro de conductas espontáneas inició en la primera semana postlesión. En la segunda semana postlesión se llevó a cabo la evaluación del daño motor con la prueba de cilindro, campo abierto y rotarod. Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos: 1) Sham, lesión con 6-OHDA sin EMTr; 2) EMTr, lesión con 6-OHDA con EMTr. La EMTr consistió en 30 estímulos de alta frecuencia (15-28 Hz) en 20 trenes con 5 segundos inter-tren durante 10 días. 24 horas después de la última sesión de EMTr se realizó una segunda evaluación del daño motor. Al final del experimento los animales se eutanizaron. Se realizaron pruebas para probar la asimetría de la extremidad anterior. El deterioro del uso de la pata delantera contralateral durante el contacto con la pared disminuyó en el grupo EMTr. Mientras que el uso de la pata anterior ipsilateral en el grupo EMTr aumentó en comparación con el grupo Sham ($t= 1.96$, $p < 0.05$). En la prueba de rotarod incrementó significativamente la latencia de caída en el grupo EMTr en comparación con el grupo Sham ($p=0.028$). En contraste, el grupo Sham soportó mayor velocidad en el rotarod ($p=0.025$). En la prueba del campo

abierto el porcentaje de tiempo de movimiento en el grupo EMTr fue menor al grupo Sham ($t = -3.626$, $p < 0.001$).

Los resultados muestran una relación entre las ratas lesionadas con 6-OHD y la EMTr. Sin embargo, el desempeño de las ratas durante la evaluación pudo ser afectado por el poco tiempo de reposo postestimulación; a su vez, esto pudo ser una variable para que sus efectos rehabilitadores no se notaran en la evaluación de las pruebas. En conclusión, la EMTr tiene efectos benéficos sobre el deterioro motor inducido por la lesión del HPM en la rata.

Introducción

*La mente del hombre es capaz de todo porque todo está en ella,
tanto el pasado como el futuro
Joseph Conrad*

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después del Alzheimer. Se presenta en el 1% de las personas mayores de 60 años y en el 2% de aquellas con 75 años o más (Martínez-Martín et al., 2014). Los estudios epidemiológicos en México son bastante viejos para dar una cifra de los pacientes parkinsonianos. Datos del Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI) estiman que para el 2020 los adultos mayores de 60 años representarán el 12% de la población nacional, elevándose esta cifra a 23% para el 2050 (Secretaría de Salud, 2010). Por lo tanto, es necesario conocer diferentes técnicas que atiendan esta enfermedad neurodegenerativa y sus principales síntomas.

Fue descrita por primera vez hace poco más de 200 años por James Parkinson en su texto *An essay of the Shaking palsy*, donde describe seis casos clínicos de una enfermedad conocida entonces como la parálisis temblorosa. Parkinson notó algunos de los síntomas que identificarían a la enfermedad que ahora lleva su nombre: temblores, rigidez de movimiento, pérdida del equilibrio, desorientación. Por esto mismo, actualmente se clasifica a la EP como una enfermedad motora; aunque también se presenta demencia, problemas de empatía, conductuales y en la autonomía de quienes la padecen y, en algunos casos depresión. Los síntomas de la EP pueden producir la muerte cuando se vuelven muy severos.

Estos síntomas se hacen vigentes debido a una disminución del 90% de la dopamina en el cuerpo estriado (Cascajares, 2017). La dopamina es uno de los neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC) pertenecientes a la familia de las catecolaminas que son compuestos formados por un núcleo catecol y una cadena de etilamina. Esta familia está compuesta por la noradrenalina, adrenalina y

dopamina. Ésta última participa en distintas funciones dentro del SNC como actividad locomotora, afectividad, la regulación neuroendócrina y la ingesta de agua y alimentos (Dandekar et al., 2017; Fibiger, 1993). La dopamina (DA) es sintetizada en las neuronas dopaminérgicas donde se encuentra la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (L-DOPA).

Cuando el balance existente entre los ganglios basales (GB) y la DA se rompe, surge la EP. La causa de los síntomas de la EP se deben a una pérdida de las fibras de la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) (Decressac, Mattsson, & Björklund, 2012) y a una denervación de las neuronas dopaminérgicas en los GB. A ciencia cierta, no se conoce a qué se debe la pérdida de este balance en los GB. Los modelos genéticos proponen la expresión de algunos genes que desencadenan la muerte de las células dopaminérgicas en la región. A su vez, la toxicidad de la DA que aumenta con los años puede jugar un papel importante en la génesis de la enfermedad.

Pese a que la evolución en el conocimiento del trastorno ha avanzado, todavía no es suficiente para saber con toda certeza qué lo origina. Algunos tipos de Parkinson son debidos a unos genes que han sido identificados como responsables de su desarrollo, mientras que algunos factores ambientales también toman un papel relevante. A grandes rasgos, la etiología de la EP puede entenderse como una combinación entre factores genéticos, ambientales y biológicos, sin que uno tenga más peso que el otro (Fig. 1).

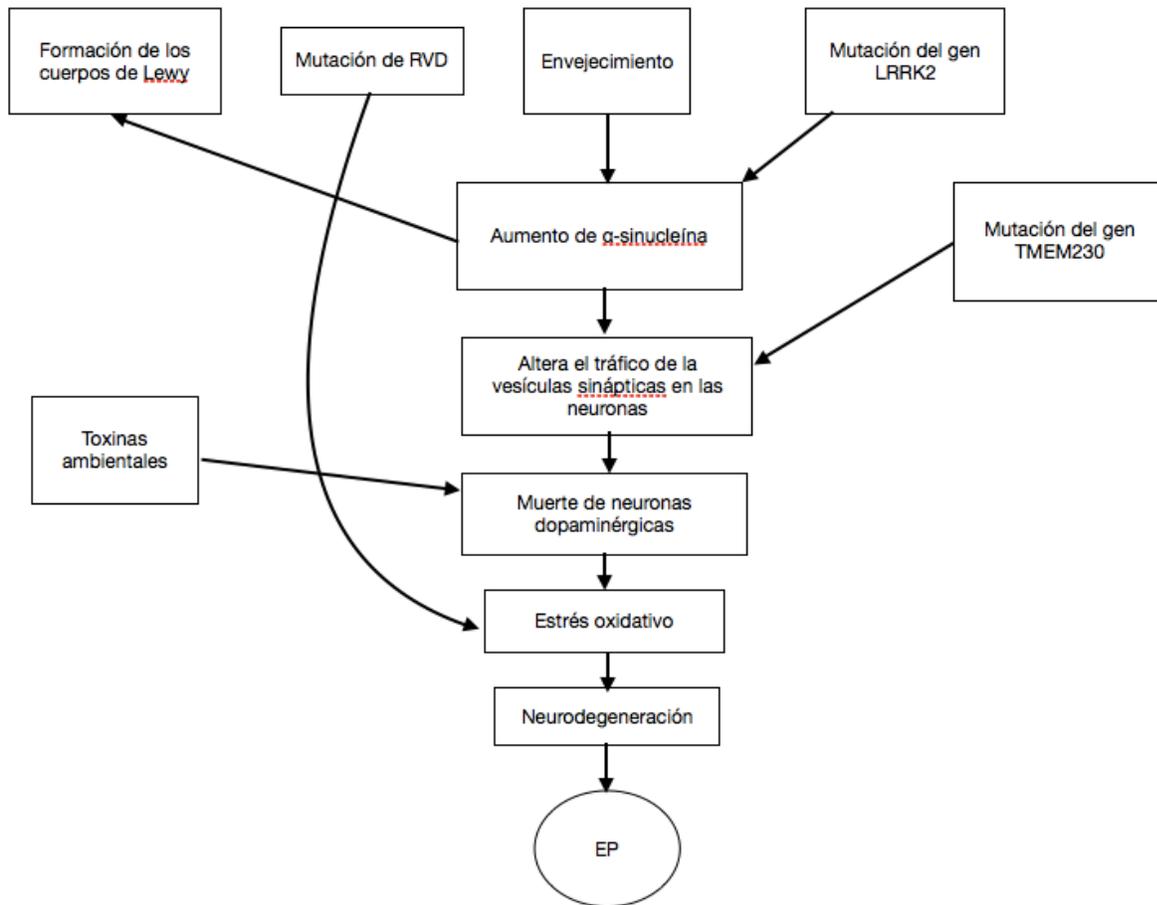


Figura 1. Esquema general propuesto en este trabajo para mostrar las diferentes variables que pueden jugar un papel en la etiología de la Enfermedad de Parkinson.

Debido al apogeo de la genética, los modelos genéticos de la EP son los favoritos para explicar su aparición en las personas. Algunos de los genes encontrados hasta ahora y que son responsables del desarrollo del trastorno son: TMEM230, LRRK2 y RVD. Un estudio publicado recientemente (Deng et al., 2016), se encargó de estudiar los genes de una familia que sufrió de la EP durante dos décadas. Tras un análisis del material genético familiar, se descubrió que una mutación en el gen TMEM230 aparecía en todos los casos. Esta mutación, altera el tráfico de vesículas sinápticas entre neuronas —incluyendo dopaminérgicas— lo que a largo plazo termina expresándose en la EP. En otro estudio se analizó una base de datos de la clínica de desórdenes de movimiento de la Universidad de Washington para saber si había una relación entre pacientes con EP y el gen estudiado. Concluyeron que la mutación en el gen TMEM230 tiene relación con un tipo de EP, por lo que son necesarios más estudios en familias para llegar a resultados concluyentes (Ibanez et al., 2017).

Por otra parte, el gen LRRK2 es un gen con una amplia cadena de aminoácidos (2527) (Deng et al., 2016). Tiene su expresión en los GB e hipocampo. Recientemente se ha detectado que una mutación en específico de este gen puede desactivarlo creando un aumento en el número de α -sinucleína, que produce la EP y, además, genera cuerpos de Lewy (Marchese et al., 2018). Los cuerpos de Lewy son estructuras localizadas cerca de las neuronas, y su presencia en zonas como la sustancia *nigra* son usadas como criterio diagnóstico para Parkinson (Toro, 2010). Se han relacionado con la presencia de demencia en pacientes con EP avanzado, además de encontrarse en personas que padecen a un deterioro cognitivo agudo, como Alzheimer (Peña Llamas, Fernández García, & Fernández Blázquez, 2010).

Finalmente, la vitamina D también tiene protagonismo en esta enfermedad. Se obtiene en el cuerpo por medio de la radiación solar, y recientes estudios han marcado su relevancia en la aparición de algunas enfermedades. Un equipo de Irán (Meamar et al., 2016) encontró una relación entre algunas expresiones genéticas

que afectaban a los receptores de vitamina D (RVD). El mismo equipo marca la importancia de los RVD en la sustancia *nigra*, un área fuertemente relacionada con la EP. La reducción en los niveles de vitamina D provoca un aumento en el estrés oxidativo, que es una de las características celulares en pacientes con EP. Además, la vitamina D genera las células T encargadas de degradar los niveles de α -sinucleína, al haber una disminución en la vitamina D las células T no se activan y los niveles de α -sinucleína aumentan junto con el riesgo de la aparición de la EP (Shen & Ji, 2015).

Los casos donde los genes sean los que explican la aparición de esta enfermedad sólo ocupan un 20% de esta población (Ascherio & Schwarzschild, 2016). Esto quiere decir que hay otras variables que tienen un papel en la aparición de la enfermedad, ya sea haciendo que un gen se exprese o se cambie la fisiología de la célula matándola y generando los síntomas del Parkinson. La relación genes-ambiente es conocida como epigénesis (Ehrlich, 2005), y hace más difícil poder decir a ciencia cierta qué produce la enfermedad. Por ejemplo, la exposición prolongada a metales, como el zinc o magnesio generan estrés oxidativo (Wirdefeldt et al., 2011). El estrés oxidativo es causado por un aumento en los radicales libres de las células, cambian el balance metabólico de éstas llevándolas a la muerte. Este fenómeno molecular es la base de un gran número de enfermedades neurodegenerativas (Chihuailaf, R.; Contreras, P. A.; Wittwer, 2002). Por su parte, la exposición prolongada a pesticidas provoca degeneración de las neuronas dopaminérgicas (ND). En la década de los 80's se detectaron síntomas parkinsonianos en usuarios de un opiáceo contaminado con 1-metil-4-fenil-2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Campdelacreu, 2014).

Zonas cerebrales relacionadas

Los GB son estructuras subcorticales cerca del tálamo con gran relevancia en la aparición de la EP. Se componen por la sustancia *nigra*, putamen, globo pálido (GP) y cuerpo estriado (Clark, Boutros y Mendéz, 2012). En conjunto, los núcleos albergan hasta el 70% de todo el SNC (De la Fuente, 2012). Dentro del cerebro de los mamíferos existen diferentes zonas del cerebro donde exciten neuronas dopaminérgicas que envían o reciben DA. En la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) se encuentra el grupo A9 y poco más abajo en el área tegmental ventral (VTA) el grupo A10. Ambos grupos proyectan al estriado dorsolateral (núcleo caudado y putamen) y el GP y hacia el estriado medioventral (núcleo acúmbeo NAcc), la amígdala (Amíg) y el tubérculo olfatorio (Otub) (Mart & Ramos, 2006). En la corteza también se sitúa el área motora primaria (M1). La M1 se divide en dos partes. Por un lado, la parte rostral evolutivamente más vieja que proyecta a la médula; y en el otro la parte caudal presente en animales ubicados más arriba en la escala filogenética y encargada del movimiento de manos, dedos y hombros (en la fig. 2 se pueden observar todas las conexiones de los núcleos encargados del movimiento).

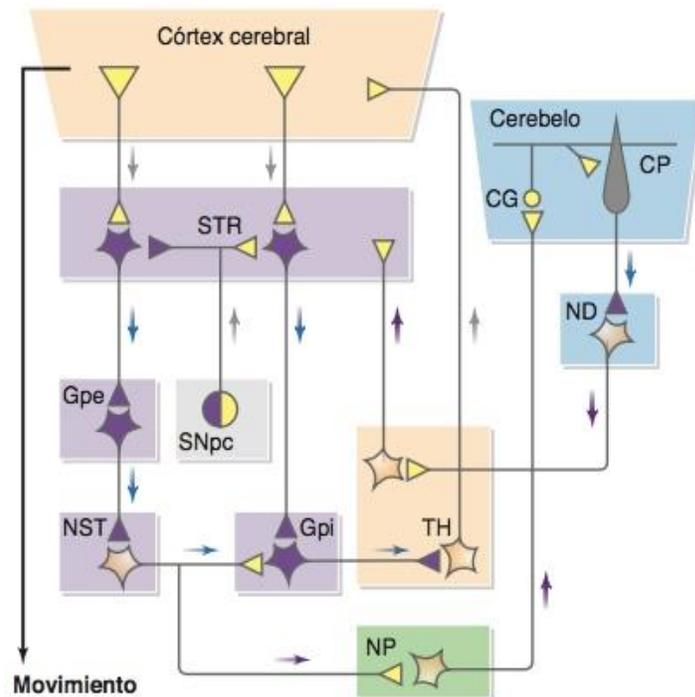


Fig. 2. Conexiones anatómicas entre los ganglios basales, corteza cerebral y cerebelo. Las flechas indican la dirección de la información. Str: estriado; GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; SNpc: Sustancia nigra pars compacta; NST: núcleos subtalámicos; TH: tálamo; NP: núcleos pontinos; ND: núcleo dentado; CG: células granulares; CP: células de Purkinje. Imagen recuperada de Cherón, 2018.

El cuerpo estriado se divide en dos partes: ventral, encargada de aspectos cognoscitivos y dorsal, a cargo de funciones motoras. En él se integra la información de la corteza, tálamo y el mesencéfalo para luego proyectar una respuesta de salida hacia el mesencéfalo y al resto del cuerpo que se traduce en movimiento. Hay dos vías eferentes: directa e indirecta compuestas por unas neuronas llamadas neuronas espinosas medianas (NEM, o SPN por sus siglas en inglés *spiny projection neurons*) de naturaleza GABAérgica (90-95%) (Prensa & Parent, 1999). La vía directa se forma por neuronas espinosas medianas de vía directa (NEMd) que contienen receptores D1 lo que la hace más excitable. Se compone por el globo pálido interno (Gpi), sustancia nigra pars reticulata (SNr). Se considera que gracias a esta vía es que inicia los movimientos. Se ha demostrado que una hiperactivación de la vía directa produce hiperkinesia. Por su parte, la vía indirecta se forma por neuronas espinosas medianas de vía indirecta (NEMi) que se acoplan a receptores D2 produciendo y haciendo encargada a esta vía de la inhibición de los movimientos. Está compuesta el globo pálido externo (Gpe), núcleo subtalámico (NST) y sustancia nigra pars reticulata (SNr). A diferencia de su contraria, la hiperactivación de esta vía produce hipokinesia. La activación o desactivación de cada vía son esenciales para nuestro día a día.

Por ejemplo, cuando se quiere patear un balón, la corteza envía información del movimiento al estriado. En este caso, las NEMd se activan e inhiben al Gpi y a la SNr que se encuentran inhibiendo al tálamo. Cuando el tálamo es “libre” de procesar la información, envía la señal de movimiento a la M1 donde las células piramidales pasan la información a la médula y ésta a las motoneuronas quienes manda la información a la vía tracto córtico-espinal y la señal llega a los miembros encargados (piernas) para que se efectúe el movimiento que queremos. Una vez que la meta es cumplida, las MENi se activan y envían aferencias inhibitorias al Gpe que se encuentra inhibiendo al NST para detener el movimiento y así no estamos pateando al aire una vez que el balón sale disparado. Cuando alguna de las dos vías se daña, empiezan a aparecer síntomas que caracterizan a algunas enfermedades. V. g., los parkinsonianos tienen una rigidez en sus miembros que probablemente

puede deberse a una hiperactivación de la vía indirecta, es decir, hipocinesia (Gittis & Kreitzer, 2012).

Al estriado llegan las proyecciones de A9 y éste se encarga de inervar la DA que llega, manteniendo el correcto funcionamiento de los GB. Una disminución de DA en los GB puede derivar en problemas motores vistos en el Parkinson, Enfermedad de Huntington y Esclerosis Múltiple. En enfermos con Parkinson se ha detectado una depleción de dopamina de hasta el 90% en el estriado, lo que ulteriormente se manifiesta en signos y síntomas de la enfermedad (Guyton, 2011).

Esta depleción se debe, en algunos casos, a problemas en algunas vías de la sustancia *nigra* al estriado como el Haz Medial del Prosencéfalo (Medial Forebrain Bundle, MFB por sus siglas en inglés) —por donde pasan las neuronas dopaminérgicas A9— implicado en el circuito de recompensa (Dandekar et al., 2017). El MFB es el objetivo de muchos protocolos de investigación de la EP por ser capaz de mimetizar gran parte de los signos en animales de laboratorio.

Tratamientos

Para combatir algunos síntomas causados por el Parkinson se han desarrollado diferentes medicamentos y terapias con el objetivo de mejorar la calidad de vida del paciente. Los más populares y cuya eficacia ha sido documentada son: descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (L-DOPA), estimulación cerebral profunda (DBS, por sus siglas en inglés *Deep Brain Stimulation*), trasplante de células madre y estimulación magnética transcraneal (TMS, por sus siglas en inglés *transcranial magnetic stimulation*).

Debido a que los síntomas del Parkinson son por una disminución de DA en el estriado, se desarrolló una técnica de rehabilitación que permitía la generación de neuronas dopaminérgicas de nuevo en esa zona. El L-DOPA se implanta en las zonas responsables de la EP y facilita la síntesis de éste en DA. La ventaja de esta técnica es que se basa en el conocimiento de las causas de una enfermedad neurodegenerativa; y es el primer tratamiento eficaz contra el Parkinson ampliamente usado a lo largo de 50 años (Stefani, Trendafilov, Liguori, Fedele, & Galati, 2017). El uso prolongado de L-DOPA genera problemas motores que se vuelven visibles a corto y largo plazo, lo que ha generado la necesidad de buscar nuevas rutas para combatir a la EP (Martínez-Martín et al., 2014). A su vez se ha descrito que estos efectos secundarios tienen relación a lo avanzado de la enfermedad más que por su tiempo de uso (Gasca-salas, Obeso, Cinac, Universitario, & Puerta, 2016).

El implante de células madres se ha empleado como método contra el Parkinson desde la década de los 90. El implante de este grupo celular se basa en el hecho de que las células madres tienen la capacidad de autorrenovación, capacidad inmunomoduladora, y de diferenciarse y reemplazar el tejido dañado (Clares, 2017). Se ha visto que son capaces de reemplazar las neuronas dopaminérgicas en el estriado y núcleos subtalámicos. Sin embargo, los resultados son contradictorios. Los tejidos implantados tienen una supervivencia baja y el método para conseguir las células dificulta obtener una gran cantidad que permita al paciente poder tener mejoras importantes (Costa & Comabella, 2012).

La DBS es una técnica invasiva que consiste en colocar un electrodo en los núcleos subtalámicos o directamente en las vías dopaminérgicas como es el caso del MFB para estimular a una frecuencia de 130 Hz (Dandekar et al., 2017). Su uso en el tratamiento de la EP viene desde la década de los 50 por los fisiólogos Hassler y Riechert, quienes lesionaron los núcleos talámicos para quitar los temores, discinesia, rigidez y mejorado el equilibrio de los pacientes (Langevin, Salles, Kosoyan, & Krahl, 2010). Se asume que la DBS en zonas talámicas o núcleos subtalámicos como la SNpc activa las neuronas dopaminérgicas que proyectan al Gpi y aumenta la DA en los GB (Gubellini, Salin, Kerkerian-Le Goff, & Baunez, 2009). Esta técnica tiene el inconveniente de que para ser candidato uno debe pasar por una serie de filtros muy difíciles de cumplir en ocasiones; además, es recomendada en estadios muy avanzados de la enfermedad y no ayuda a detener el avance de la enfermedad.

Las técnicas descritas permiten ver la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para combatir la EP de forma efectiva y duradera, al mismo tiempo evitando los efectos colaterales. En ese sentido, a mediados de la década de los 80 se utilizó la EMT como método no invasivo contra la EP y otras enfermedades neurodegenerativas (Lefaucheur et al., 2014). El principio que usa esta técnica está basado en la ley de electromagnetismo de Faraday-Maxwell, la cual propone que toda corriente eléctrica produce un campo magnético de forma perpendicular y viceversa. A estos campos se les llaman campos electromagnéticos (CEM), y se caracterizan tanto por su longitud de onda, frecuencia y nivel de energía. Por frecuencia se entiende el número de oscilaciones en un determinado tiempo, cuya unidad de medida es el hercio (Hz). La longitud de onda es la distancia recorrida por la onda en cada ciclo (metros). Mientras que el nivel de energía depende directamente de la frecuencia de la onda (Verdugo-Díaz & Drucker-Colin, 2014). Es importante mencionar que antes de iniciar una sesión con EMTr se debe saber cuántos pulsos se darán, el tiempo de estimulación y la longitud de onda. La longitud de onda se saca a partir de un pulso magnético en la corteza premotora del sujeto, buscando el umbral en el que se genera una conducta motora evocada. Por ejemplo, en humanos suelen mover sus manos de forma involuntaria o los pies; mientras que en roedores hay mo-

vimiento de las patas delanteras e incluso masticación. Un pulso provoca la activación de un grupo de neuronas que se conectan con otras de diferentes áreas y según la zona estimulada puede producir cambios a nivel molecular (Neggers, Petrov, Mandija, & Sommer, 2015). En la figura 1.4 se puede observar una imagen representativa que muestra cómo se realiza la estimulación en roedores.

La EMT envía un pulso de corriente eléctrica a través de una bobina, en ese momento se genera un campo magnético que atraviesa el cuero cabelludo y el cráneo sin disminuir su fuerza. Dos tipos de bobinas son utilizadas en esta técnica: en forma de ocho que produce un campo electromagnético más localizado; y una bobina circular que permite estimular ambos hemisferios en un campo electromagnético más amplio. Esta corriente electromagnética produce cambios en la corteza a nivel neuronal, inhibiéndolas o estimulándolas. El efecto que se quiera obtener depende de qué bobina se utilice, la zona estimulada, la intensidad del campo magnético, la frecuencia y duración de los pulsos. Dentro de las diferentes modalidades existentes de la EMTr, la más utilizada para la investigación de la EP y que ha dado más resultados positivos es la estimulación magnética transcraneal repetitiva (EMTr) (Ruiz, Sarasa, Rodríguez, Ristol, & Arce, 2016).

La EMTr es usada como método eficaz contra enfermedades neurodegenerativas. Existen dos tipos de parámetros en que puede ser usada: alta o baja frecuencia. Se considera baja frecuencia cuando el número de pulsos por segundo es menor a 1Hz. La EMTr de baja frecuencia produce inhibición de la actividad neuronal y un aumento de depresión a largo plazo (LTD, *long-term depression*). Por su parte, cuando los pulsos por segundo son mayores de 1 Hz se toma como alta frecuencia. Esto fomenta la estimulación de las neuronas corticales y un aumento de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés *long term potentiation*) (Medina, Pascual, & Túnez, 2014). Por lo tanto, la EMTr de alta frecuencia se usa más para fomentar la neurogénesis y la migración neuronal; así como en protocolos de investigación de EP para disminuir o erradicar los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos moleculares no son claros todavía. El objetivo común

al momento de aplicar la EMTr es la zona motora y premotora, debido a las conexiones dopaminérgicas que tiene con el hipocampo, ganglios basales y zonas más subtalámicas como la SNpc y el área tegmental ventral (Camprodon, 2014).

La evidencia experimental y clínica ha sugerido que la EMTr es muy eficaz como técnica de rehabilitación. Ha sido empleada en pacientes que presentan afasia de broca se observa una mejora significativa. Y se ha buscado usar como tratamiento alternativo contra la epilepsia, donde los resultados son muy contradictorios (Lefaucheur et al., 2014). Donde ha tenido un gran impacto es en pacientes que presentan depresión mayor resistente a fármacos. En ellos, el blanco de la EMTr es la corteza prefrontal dorso-lateral (CPFL) (Pascual-Leone, Rubio, Pallardó, & Catalá, 1996). También se ha demostrado que en roedores la EMTr a 5Hz facilita la plasticidad sináptica así como la liberación de BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*) implicado en la supervivencia neuronal y neuroregeneración (Shang et al., 2016^a).

Modelos animales

Para tener una mejor visión de las enfermedades que acosan al humano, ha sido necesario crear modelos animales que amplíen el conocimiento científico (Cardozo de Martínez, Mrad de Osorio, Martínez, Rodríguez-Yunta & Lolas-Stepke, 2006), sin perder de vista el respeto que el animal se merece por ser un ente auxiliar y ser viviente (Alicia, Martínez, Mrad, Martínez, & Rodríguez, 2006). La validez de un modelo animal debe cumplir con ciertas características, entre las que se destacan (Santana, Palmér, Simplício, Fuentes, & Petersson, 2015; Sluka, 2010):

- Validez de constructo: el modelo que se plantee debe producir los signos de la enfermedad según su etiología. En el caso de la EP, la mayoría de los modelos presentan una disminución de DA en el estriado; sin embargo, son pocos los que generan cuerpo de Lewy.
- Validez de apariencia: el modelo debe ser capaz de mimetizar los signos de la enfermedad (Santana et al., 2015). En el caso del Parkinson, los temblores, rigidez, pérdida de equilibrio y orientación.
- Validez de predicción: el modelo debe predecir los efectos de la técnica de rehabilitación en la clínica. Un modelo animal que no tiene esperanza de aplicarse en personas no debe ser llevado a cabo (Torre-Hernández & Edelman, 2017).

Son dos los modelos animales más ampliamente utilizados en el estudio de la EP por los signos que imitan de esta enfermedad: 1) 1-metil-4-fenil-2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en monos (Cannon & Añ, 2010); 2) la lesión unilateral con la neurotoxina 6-hidroxidopamina, 2,3,5-trihidroxifeniletamina (6-OHDA) en ratón y rata (Boix, Padel, & Paul, 2015).

El MPTP era un pesticida usado en los campos de cultivos de opiáceos en la década de los 80. Las personas que consumían accidentalmente cultivos infectados con este químico desarrollaron síntomas muy parecidos al Parkinson. Los investigadores no tardaron en usarlo como modelo animal para reproducir lo visto en los humanos y poder estudiar la génesis, evolución y rehabilitación de la EP. El MPTP

es recogido por la astrogía que a su vez lo convierte a través de la enzima monoamina oxidasa (MAO) en 1-metil-4-fenil 2,3, dihidropiridínico (MPDP+). Después, la MPDP+ es metabolizada y convertida en peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP+). Las neuronas dopaminérgicas recogen el MPP+ y se acoplan a la mitocondria inhibiendo el complejo I; esto genera una depleción de adenosina-5'-trifosfato (ATP) y un aumento en los radicales libres que resulta en la eventual muerte de la célula (Cannon & Å, 2010). Este proceso se reproduce en cada una de las células del estriado y deriva en los signos vistos en el Parkinson. Este modelo presenta la desventaja de que la acción del MPTP varía según la especie. Sin tener muy claro las razones, las ratas presentan una resistencia a este pesticida; y en ratones suelen tener una recuperación y deben inyectarse dosis más altas para generar los signos de la EP. En el caso de los primates no-humanos, no se han detectado resistencia o recuperación, lo que ha expandido el uso de este modelo en esos animales.

El estudio del Parkinson con la 6-OHDA viene desde 1968 (Blum et al., 2001), y desde entonces se ha convertido en el modelo más utilizado para su estudio. La 6-OHDA es una toxina con estructura molecular parecida a la DA (fig. 3), lo que la hace afín a los receptores de las catecolaminas. Al ser muy propensa a la oxidación, al momento de su preparación se usa ácido ascórbico (vitamina C). Son dos los núcleos donde se inyecta la 6-OHDA: el estriado y el MFB. Según lo que se esté investigando es dónde se inyecta la toxina (Bové, Perier, Diseases, & Re-, 2012). En el primer caso, se busca conocer los mecanismos de muerte celular y la pérdida de DA depende de la dosis utilizada. Cuando se inyecta en el MFB, el objetivo es conocer las consecuencias de la muerte neuronal y estudiar estrategias terapéuticas contra los síntomas motores. Veinticuatro horas después de inyectar la 6-OHDA en el MFB inicia la muerte de los grupos neuronales A9 y A10, con proyecciones al estriado. Entre el primer y tercer día, la pérdida de DA puede apreciarse con claridad y en tres semanas el estriado está vacío de DA. Gracias a estas características, el modelo 6-OHDA con el MFB como objetivo es considerado un modelo agudo. En ambos casos, la lesión puede producirse de forma unilateral o bilateral. Las ventajas de la lesión unilateral son que la mortalidad es menor; aunque hay estudios donde,

con cuidados especiales, los animales lesionados bilateralmente sobreviven (Costantini & Isacson, 2000).

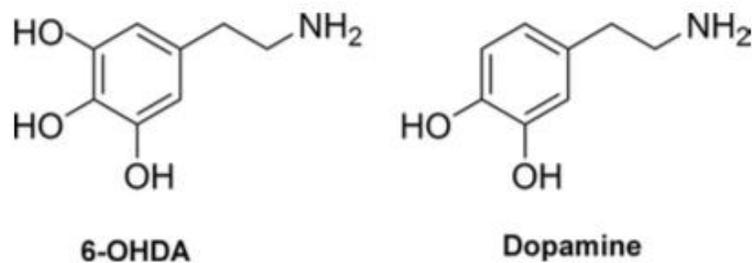


Fig. 3. Similitudes químicas de la 6-OHDA y la Dopamina. Imagen recuperada de Bové 2012.

El mecanismo de muerte celular de la 6-OHDA es similar a la toxicidad que tiene la DA de forma natural. En el caso de la DA, su auto-oxidación va en aumento con la edad de las personas. A cierta edad, la dopamina genera metabolitos tóxicos que desencadenan altos niveles de radicales libres, produciendo estrés oxidativo que, a su vez, bloquea el complejo I de la mitocondria. En este punto, se dispara una cascada de reacciones moleculares que finalizaran con apoptosis celular. En pacientes con EP se ha encontrado una disminución significativa del complejo I (en un rango del 30%), lo que sitúa a este mecanismo como uno de los protagonistas dentro de la enfermedad.

Con la 6-OHDA pasa algo similar. Entra a la célula a través de los transportadores de dopamina (DAT, por sus siglas en inglés de *dopamine active transporter*). Adentro de la célula genera especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés de *reactive oxygen species*) que aumentan los niveles de estrés oxidativo lo que desencadena dos tipos de muerte celular que dependen de las características de la membrana de la mitocondria:

- **Apoptosis intrínseca:** inicia cuando las ROS activan el gen p38 que estimula la proteína Bax. Ésta es una proteína pro-apoptótica perteneciente a la subfamilia de la proteína Bcl-2. Esta familia de proteínas es importante para mantener vivas a las células, pues los grupos Bcl-2 se activan al momento de “salvar” una célula de morir por apoptosis (inhibidores de apoptosis); mientras que el grupo Bax se

activa cuando la célula es un riesgo para el organismo (inductores de apoptosis). En algunas enfermedades neurodegenerativas, un error en la expresión de estas proteínas desencadena apoptosis en células que no deben morir o, en el caso del cáncer, mantiene vivas células que dañan el organismo. Así, cuando Bax se activa se une al transportador mitocondrial de nucleótido de adenina (ANT) induciendo la apertura de un poro que rompe con el potencial de la membrana mitocondrial. Cuando esto ocurre, se libera la proteína citocromo C que interactúa en el ambiente celular con la procaspasa 9 formando un complejo llamado apoptosoma que activa la caspasa 9 y ésta, a su vez, funciona como una caspasa iniciadora que activa la caspasa 3. La caspasa 3 daña directamente el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el citoesqueleto causando la muerte de la célula (Martínez, Vargas, & Arancibia, 2003).

- **Autofagia:** la autofagia es un mecanismo de defensa para el organismo y sirve para mantener el balance en los niveles de ROS. Cuando hay altos niveles de ROS dentro de la célula se vuelve difícil para la mitocondria procesarlos, causándole daño a ella y al ADN. Una vez que la mitocondria está dañada, se envía una señalización que libera a la proteína similar a dinamina-1 (Drp1, por sus siglas en inglés *dynammin-1-like protein*). La Drp1 inicia el proceso de fisión mitocondrial. La fisión mitocondrial se desencadena cuando la mitocondria está dañada y ya no puede llevar a cabo su función, por lo que al fisionarse se reciclan algunos componentes mitocondriales que no están dañados para hacer otra mitocondria. Sin embargo, la Drp-1 llama a otras proteínas que empiezan a generar una membrana alrededor de la mitocondria que recibe el nombre de autofagosoma. Cuando la membrana está formada, el autofagosoma interactúa con el lisosoma de la mitocondria formando un autofagolisosoma que empieza a comerse a la mitocondria dañada llevando a la muerte celular (Jordán, Solesio, & Galindo, 2014).

Planteamiento del problema

Como hemos visto, la EP es una enfermedad neurodegenerativa que afecta al 25 de la población mundial. Sus causas no son del todo claras. Las mutaciones genéticas pueden derivar en ella; aunque es tan sólo en el 10% de los casos. Esto no sólo hace difícil prevenir la enfermedad, sino también la forma más eficaz de tratar este mal. Terapias como L-DOPA, DBS y trasplante de células madre han permitido disminuir sus síntomas hasta casi extinguirlos. Pero pueden tener efectos secundarios peores (como el uso prolongado de L-DOPA); requerir filtros estrictos para ser candidatos; o ser en extremo invasivos.

Por esa razón, es imperativo probar nuevas técnicas que disminuyan –incluso erradiquen—los efectos secundarios y mejore la calidad de vida de los pacientes. En este sentido, la EMTr se alza como una técnica innovadora no-invasiva cuyos efectos secundarios son leves y temporales. Sin embargo, los resultados en clínica son contradictorios, lo que hace necesario la experimentación en el área básica para determinar bajo qué parámetros los síntomas motores son mitigados y en qué medida revierte los efectos de la EP a nivel neuronal.

Pregunta

¿La estimulación magnética transcraneal repetitiva en la corteza premotora genera cambios conductuales en ratas wistar lesionadas en el haz prosencefálico medial con 6-OHDA?

Hipótesis

Las ratas estimuladas con EMTr tendrán una mejora en el desempeño de las pruebas conductuales en comparación a las que no fueron estimuladas

Objetivo

Generar cambios conductuales en ratas Wistar estimuladas en la vía vía corticoestriatal

Objetivos específicos

- Medir el uso de los miembros delanteros en la prueba de cilindro
- Observar el movimiento de las ratas en la prueba de campo abierto
- Observar la postura de los animales mientras realizan la prueba de rotarod
- Medir el número de caídas por animal en la prueba de rotarod

Método

Aquí hay hombres que antes de matar a las ratas
estudian concienzudamente su compleja personalidad

Elvira Lindo

Material

Aparato esterotáxico (Modelo 1430, David Kopf)

Computadora (HP), Windows 7

Cámara de vídeo (Nikon S4400)

Instrumental quirúrgico

Acrílico dental (Nic-Tone)

Cera de hueso

Gelfoham (SPONGOSTAN)

Cilindro de vidrio (19.8 cm de diámetro x 39.9 cm de largo)

Xilazina (Relajante muscular, Sigma-Aldrich)

Ketamina (Anestésico, Pisa Anesk)

Pentobarbital sódico (Pisa)

Buffer de fosfatos (Backer)

Jeringa Hamilton de vidrio de 2 μ l

Rotarod (Panlab, Harvard)

Campo abierto (24.6 cm de ancho x 26.6 cm de largo)

Alcohol al 100% y 70%

Estimulador MagPro X100

Manejo de animales

Para este estudio se usó un diseño de tipo experimental comparativo. Los procedimientos del protocolo se llevaron a cabo bajo la norma oficial mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio emitida por la SAGARPA (NOM-062-ZOO-1999) y las normas de bioética establecidas por el comité de ética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente (INPRF). Se hizo el esfuerzo de disminuir el dolor en los procedimientos quirúrgicos, asimismo disminuir el número de animales.

Se usaron 21 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 350-400 g. Los animales se mantuvieron en un cuarto a una temperatura de 22° y bajo un ciclo luz/oscuridad de 24 horas (12/12) con agua y comida estándar *ad libitum*. En la figura 4 se muestra la línea del tiempo donde se explica desde la lesión por 6-OHDA hasta la obtención de resultados.

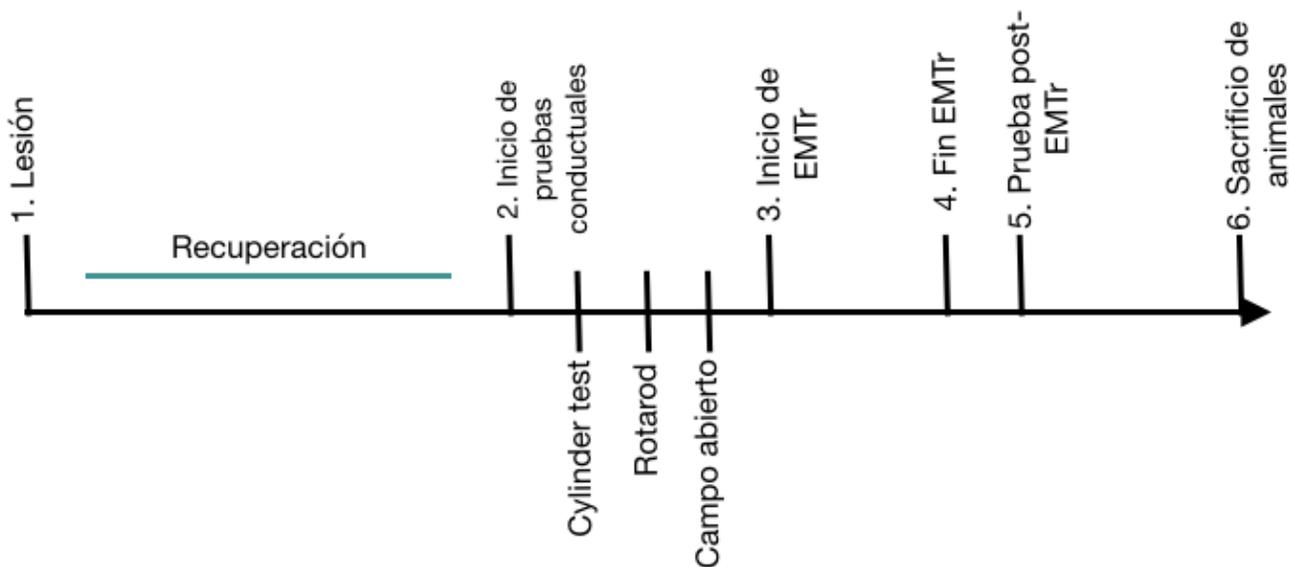


Fig. 4. Línea del tiempo que muestra el procedimiento experimental seguido a lo largo del experimento.

Lesión con 6-OHDA

Se utilizaron ratas Wistar macho con 7 meses para asemejar la aparición de la EP en edades tempranas en los humanos. Los animales fueron anestesiados con ketamina (50 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg). Se rasuró la parte superior del cráneo y la cabeza se fijó en un estereotáxico para rata. Se inyectó unilateralmente una solución de 6-OHDA (4 µg/0.6 ml ácido ascórbico; 0.5 µl/min) en el haz medial prosencefálico (MFB) derecho coordenadas: AP -1.6 mm; LM 1.5 mm; DV -7.6 mm (Paxinos y Watson, 2007). La inyección se realizó con una jeringa Hamilton de vidrio de 2 µl acoplada a una torre estereotáxica. La jeringa se bajó hasta el núcleo a una velocidad de 2 micras cada 2 minutos. Una vez en sitio, se inyectó con una microbomba de infusión la solución de 6-OHDA en un periodo de 5 minutos y se dieron dos minutos de reposo para mejorar la difusión de la toxina. La jeringa se retiró cuidadosamente y el trépano se selló con spongostan dental (ethicon MS0005) y cera de hueso (ethicon w 31). Después se suturó la incisión y se dejó a los animales en reposo durante una semana.

Pruebas conductuales

Prueba del cilindro

Primero se aplicó la prueba del cilindro que evalúa la lateralización de la rata con los toques espontáneos que hace con miembros delanteros, partiendo de la conducta exploratoria e instintiva de los roedores. Las ratas se colocan de forma individual dentro de un cilindro de vidrio (19.8 cm de diámetro x 39.9 cm de largo). En la sesión se usaron dos cámaras de vídeo: una en la parte superior del cilindro y otra enfrente de éste para tener una mejor perspectiva de la actividad del animal. No es necesario habituación previa para aplicar esta prueba. El desempeño de la rata en la prueba se analizó con un programa de vídeo. Se contó el número de veces que la rata tocó las paredes del cilindro con las patas delanteras, sin importar si fue ipsilateral o contralateral a la lesión; también se contó el número de *rearings* (levantada en sus patas traseras) que tuvo. El número de veces que tocaba con ambas patas las paredes del cilindro fueron excluidas del análisis. Los datos se expresaron

porcentaje de toques que tuvo con la pata ipsilateral o contralateral (toques contralaterales)/ (toques ipsilaterales + toques contralaterales x 100).

Rotarod

Después de terminar la prueba del cilindro, el déficit motor de los animales era evaluado con la prueba de rotarod. Consiste en un cilindro de 10 cm de diámetro que gira sobre su mismo eje un determinado número de revoluciones por segundo. La velocidad es determinada por el tipo de protocolo de rotarod que se use. En este experimento se usó la aceleración gradual del rotor (*ARR*, por sus siglas en inglés de *rotation rate of the rod accelerated*), por ser más óptimo para conocer el impacto de la lesión y los beneficios de las técnicas de rehabilitación (Monville, Torres, & Dunnett, 2006). En este protocolo la velocidad inicial es de 4 rpm y aumenta de forma gradual hasta 44 rpm en un lapso de 5 minutos. Cuando un animal se caía del cilindro durante la prueba, se detenía el tiempo, se ponía la velocidad a 4 rpm de nuevo y colocaba en el cilindro para continuar. Tres días antes de la sesión, las ratas fueron entrenadas para ella. El entrenamiento consistió en poner a las ratas en el cilindro en movimiento a 10 rpm durante 5 minutos. Todas las sesiones de entrenamiento y prueba fueron videograbadas para calificar si habían aprendido o no la tarea. Se tomó en cuenta el número de caídas total, la latencia a la primera caída y velocidad promedio alcanzada.

Campo abierto

La prueba de campo abierto consiste en una caja oscura de madera (24.6 cm de ancho x 26.6 cm de largo). El piso de la misma está dividido en 9 cuadrantes cada uno con una dimensión de 18 x 18 cm. Cada rata fue colocada en el cuadrante del centro y se observó su conducta durante 20 minutos. El número de veces que entró en un cuadrante (las cuatro patas dentro del cuadrante), el número de veces que entró al cuadrante central, el número de *rearings* y el número de veces que se acicaló fueron contadas. Después de que un animal terminaba la prueba, el piso de la caja era limpiado con alcohol para evitar dejar huellas o señales que generaran estrés en los otros animales.

Estimulación Magnética Transcraneal

Los animales fueron divididos en tres grupos de forma aleatoria: 1) control, sin lesión ni estimulación; 2) falso estimulado (SHAM), con lesión, pero sin estimulación; 3) EMTr con lesión y estimulación. El estimulador utilizado fue un MagPro X100 con bobina circular. La estimulación constaba de 30 estímulos de alta frecuencia (5 Hz) con una amplitud entre 15-25 micras en 20 trenes con una separación entre cada uno de 5 segundos en un período de 10 días a la misma hora. Todas las sesiones fueron videograbadas y llevadas a cabo un cuarto aislado de ruido, bien iluminado y con correcta ventilación. Un día antes de iniciar las sesiones, se sacó el umbral de respuesta motora a todas las ratas. Los animales no eran sometidos a ningún tipo de anestesia, por lo que eran sujetadas con la mano desde su espalda en posición de chaleco para facilitar poner su cabeza en la bobina del estimulador. Para verificar que se estaba en el sitio de estimulación, se lanzaba un pulso único; si se evocaba una respuesta motora, se iniciaba la EMTr. En el caso del grupo SHAM, los animales recibían la misma manipulación, pero se dejaba un espacio entre la bobina y el cráneo de 10 cm. 24 horas después de la última sesión de EMTr, se volvió a aplicar la misma batería de pruebas conductuales (fig. 5).



Fig. 5. Imagen que ejemplifica la forma en que la bobina es colocada para la estimulación de las ratas

Análisis estadísticos

Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilks aceptando la normalidad cuando $p > 0.05$. Para ver los cambios entre los tres grupos en la prueba del cilindro, se realizó una ANOVA one-way con la prueba post hoc Bonferroni. Los cambios vistos en el campo abierto y rotarod fueron analizados con la prueba Kruskal-Wallis. Se usó la prueba post-hoc U de Mann-Whithney para ver la dirección de los cambios. Para ver si hubo cambios en el desempeño de los animales antes y después de la estimulación, se usó la prueba de rangos de Wilcoxon. Los datos obtenidos se representan en medias de la muestra y desviación estándar para las pruebas paramétricas; y en medianas y rangos para los no paramétricos.

Para ver los cambios en el desempeño de las ratas antes y después de la estimulación en la prueba de rotarod, se tomó el tercer día de entrenamiento como punto de comparación con la aplicación de la prueba post EMTr.

Resultados

1) Prueba del cilindro

En la prueba del cilindro se evaluó en tres diferentes periodos para observar el avance de la lesión y la recuperación después de la estimulación. La figura 1 representa el aumento en el uso del miembro delantero izquierdo en los tres grupos. Se puede observar que el grupo EMTr es el que menor número de toques tuvo en comparación con los demás grupos, sin ser este resultado significativo. El grupo SHAM mostró un aumento en el uso del miembro izquierdo después de la estimulación en comparación a las dos evaluaciones previas ($p = 0.028$). El grupo Control también incrementó el uso del miembro izquierdo, sin ser significativo ($p = 0.058$).

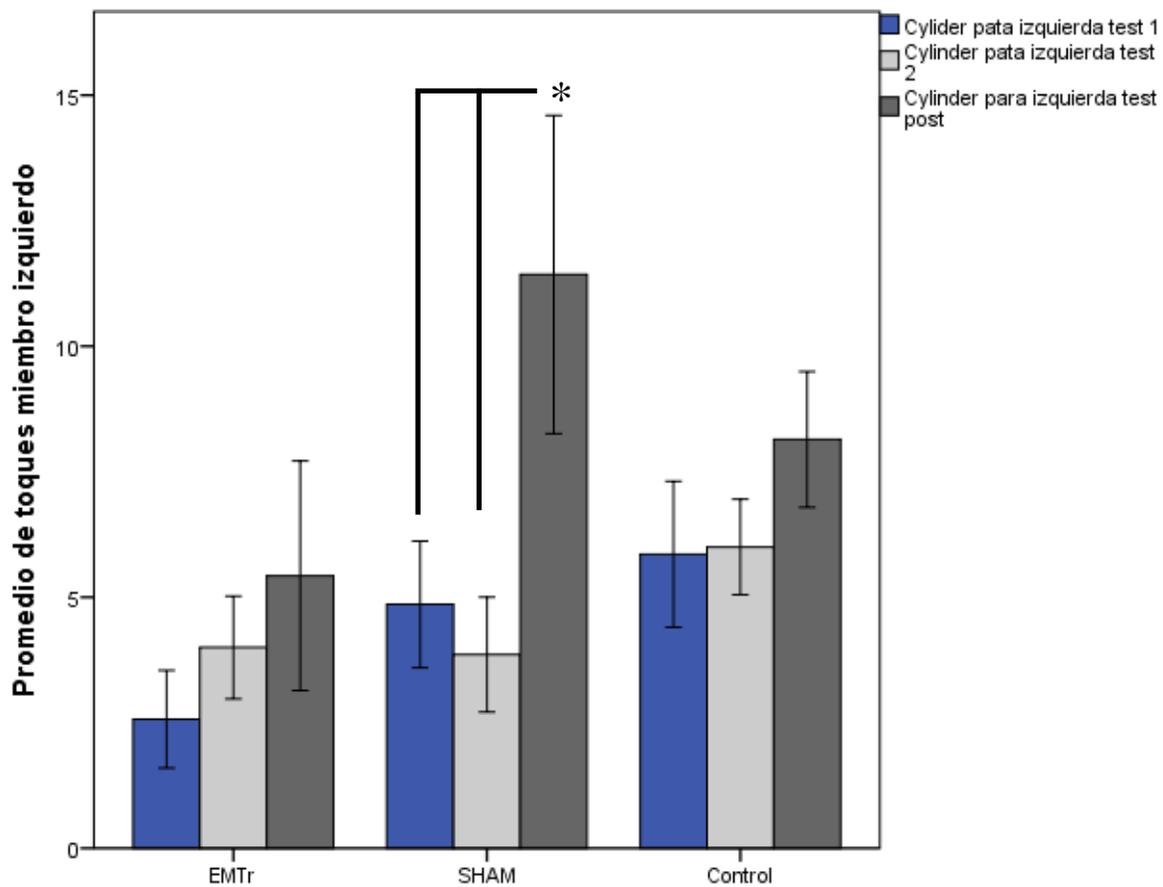


Figura 1. Promedio de toques con miembro izquierdo. Se observa un aumento en el grupo SHAM y Control después de la estimulación

Para evaluar el miembro derecho se analizaron las tres diferentes aplicaciones de la prueba del cilindro. Los animales EMTr y SHAM mostraron un desempeño bajo en la primera y segunda evaluación de la prueba en comparación al grupo Control ($p = 0.007$ y $p = 0.026$). Se aprecia en la figura 2 que los animales estimulados tienen un aumento en el número de toques después de la estimulación; sin embargo, este resultado no es significativo. Por otro lado, el grupo Control atenuó el uso del miembro derecho en comparación a la primera vez que hizo la prueba ($p = 0.018$).

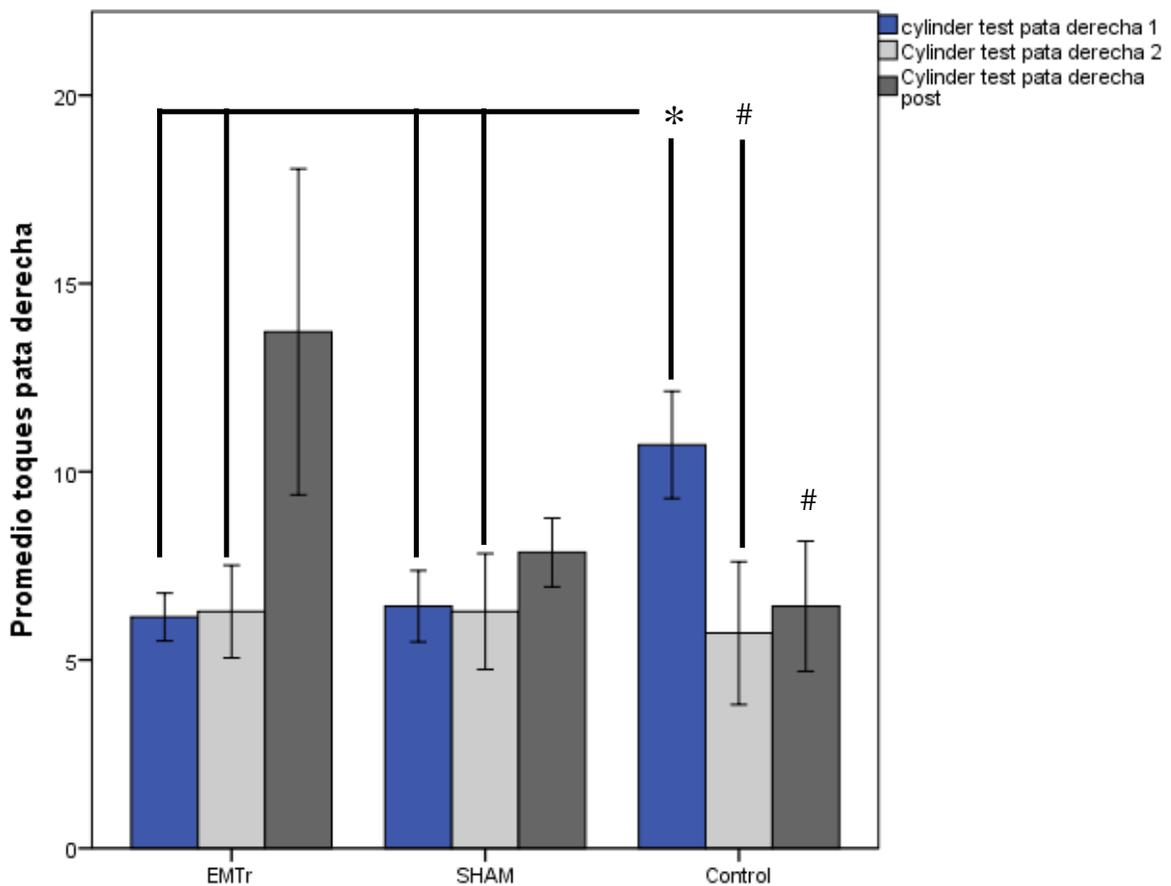


Figura 2. Promedio de toques de la para derecha. Se puede apreciar un aumento en la actividad del grupo EMTr después de la estimulación.

Por último, se analizaron el número de *rearings*. En la figura 3 se puede observar el promedio, las diferencias entre los grupos y los cambios que cada uno presentó en las tres aplicaciones de la prueba.

A pesar de notarse diferencias en el desempeño de los grupos, ninguna de éstas es estadísticamente significativa. Sin embargo, sí se detectaron cambios en el desempeño de las ratas a lo largo del experimento. El grupo EMTr mostró un aumento en el número de *rearings* ($p = 0.051$), igual que el grupo SHAM ($p = 0.018$). El grupo Control no varío mucho en la expresión de esta conducta.

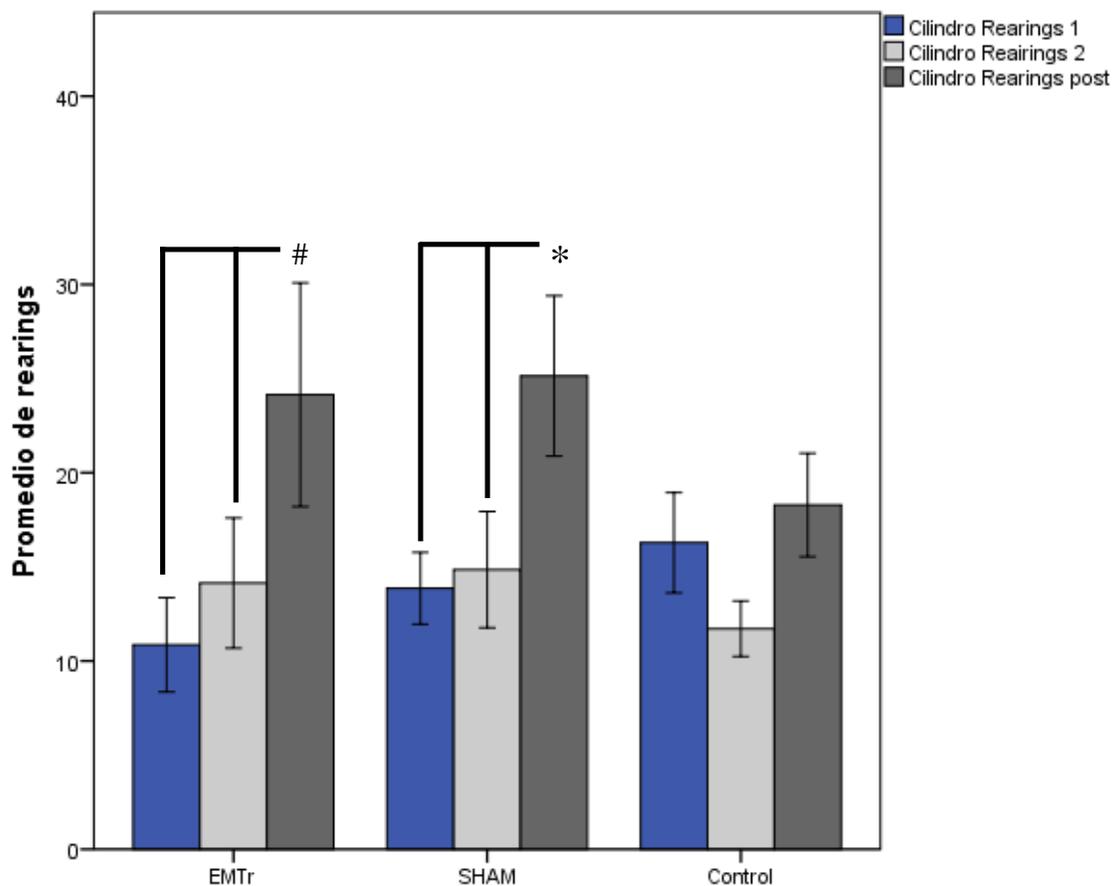


Figura 3. Promedio de *rearings*. Hay un aumento significativo en el número de *rearings* en los grupos SHAM y EMTr.

2) Campo abierto

En la figura 4 se pueden observar diferencias en el tiempo de movimiento sin ser significativas ($p = 0.067$). En particular, el grupo EMTr tuvo más actividad durante la prueba que los dos grupos restantes. Además, el grupo Control muestra un bajo tiempo de movimiento lo que puede deberse a la condición estresante que induce la prueba. Cuando se aplicó la prueba post-hoc U de Mann-Whitney se encontró que antes de la estimulación el grupo SHAM tenía más actividad que el Control ($p=0.018$). Después de la estimulación tanto el grupo EMTr como SHAM disminuyeron su conducta, siendo este cambio limítrofe cuando se hace la comparación SHAM vs Control ($p = 0.053$).

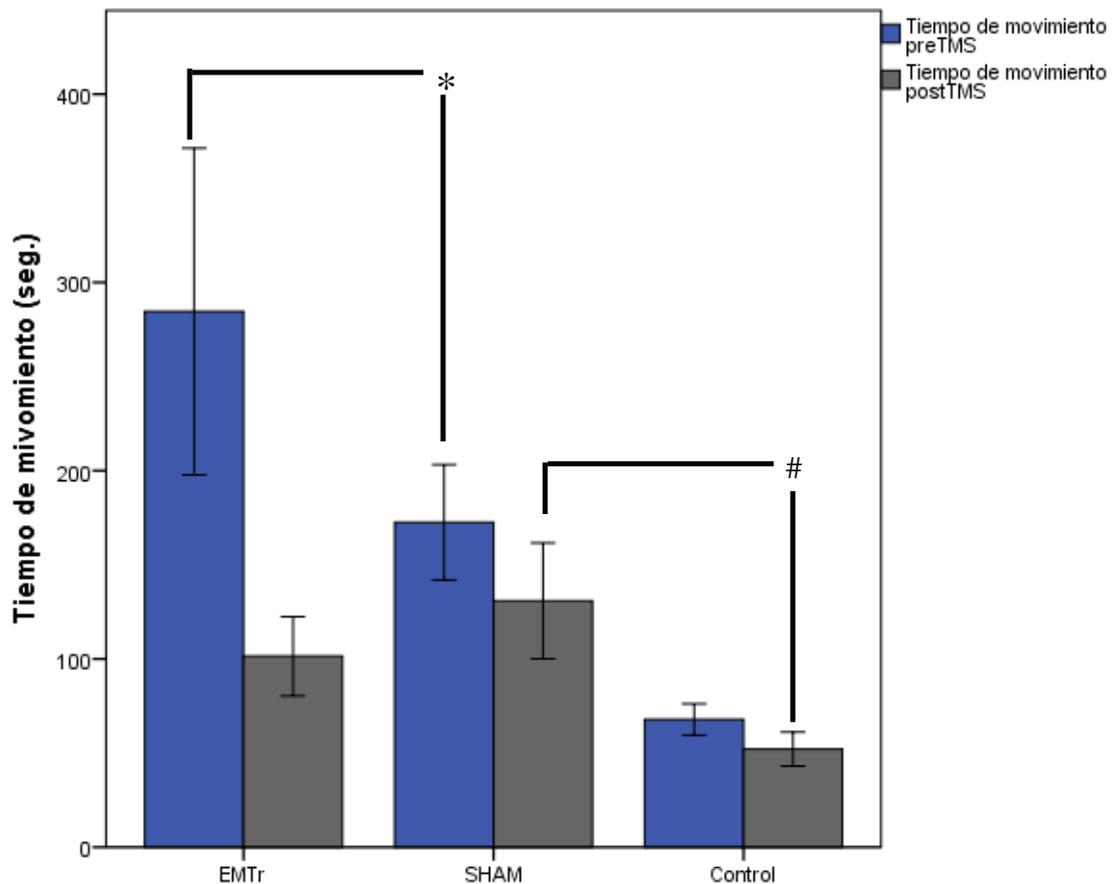


figura 4. Tiempo de movimiento en la prueba de campo abierto. Se puede notar un cambio en la conducta de los animales EMTr después de la estimulación. Mientras que el grupo Control se mantiene con un promedio bajo.

Antes de la estimulación, no se detectaron diferencias en el promedio de entradas al centro en ninguno de los grupos ($p = 0.416$), como se puede observar en la figura 5. Sin embargo, después de la técnica de rehabilitación se encontró que el grupo EMTr y SHAM aumentaron su promedio de entradas en comparación al Control ($p = 0.006$ y $p = 0.026$). No se hallaron diferencias antes y después en cada uno de los grupos.

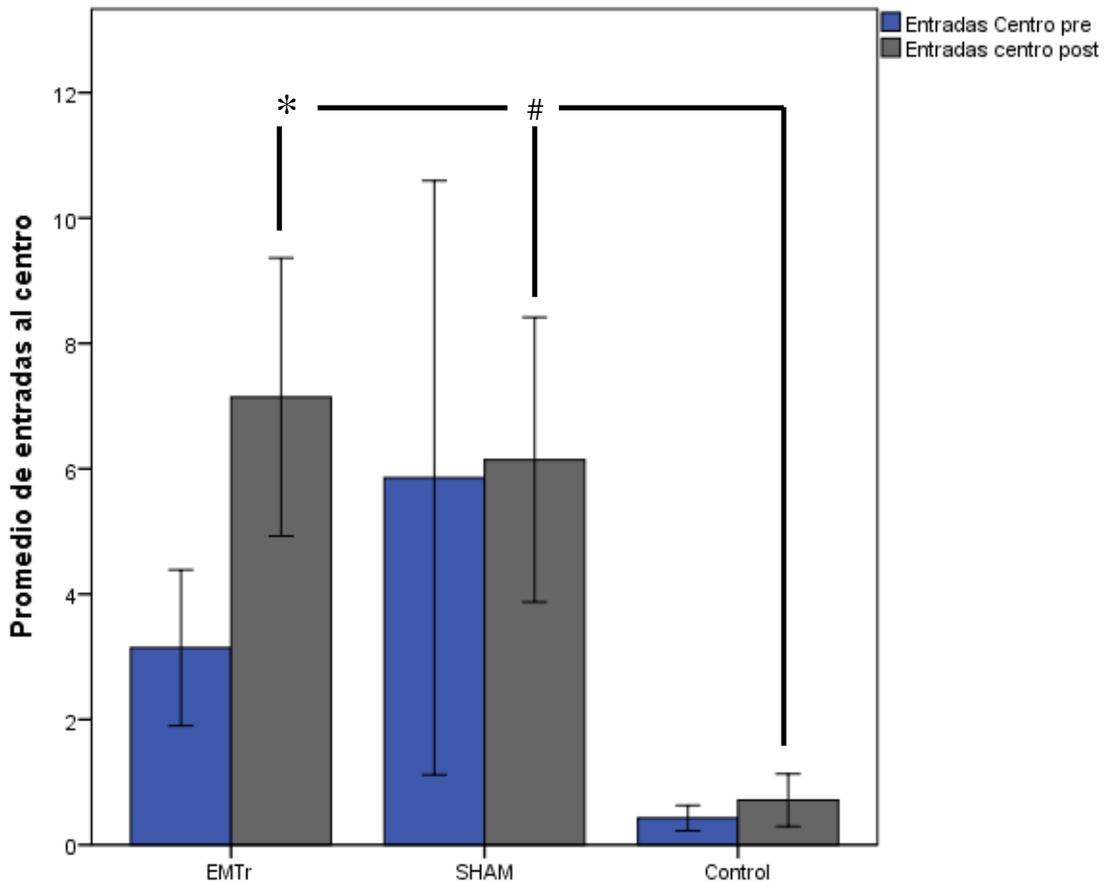


Figura 5. Promedio de entradas al centro. Todos los grupos tuvieron un aumento en el número de veces que entraron al centro, siendo significativa sólo la de los grupos EMTr y SHAM.

El tiempo promedio que las ratas pasaron en el centro (figura 6) en la prueba antes de la estimulación fue mayor en los grupos que recibieron la 6-OHDA, siendo límite en la comparación SHAM vs Control ($p = 0.053$). Sin embargo, esta diferencia aumentó una vez aplicado el tratamiento. Los animales EMTr aumentaron el tiempo en el centro de forma significativa en comparación al grupo Control ($p = 0.018$). De la misma forma, los animales SHAM tuvieron un incremento en el tiempo que pasaron en el centro ($p = 0.026$).

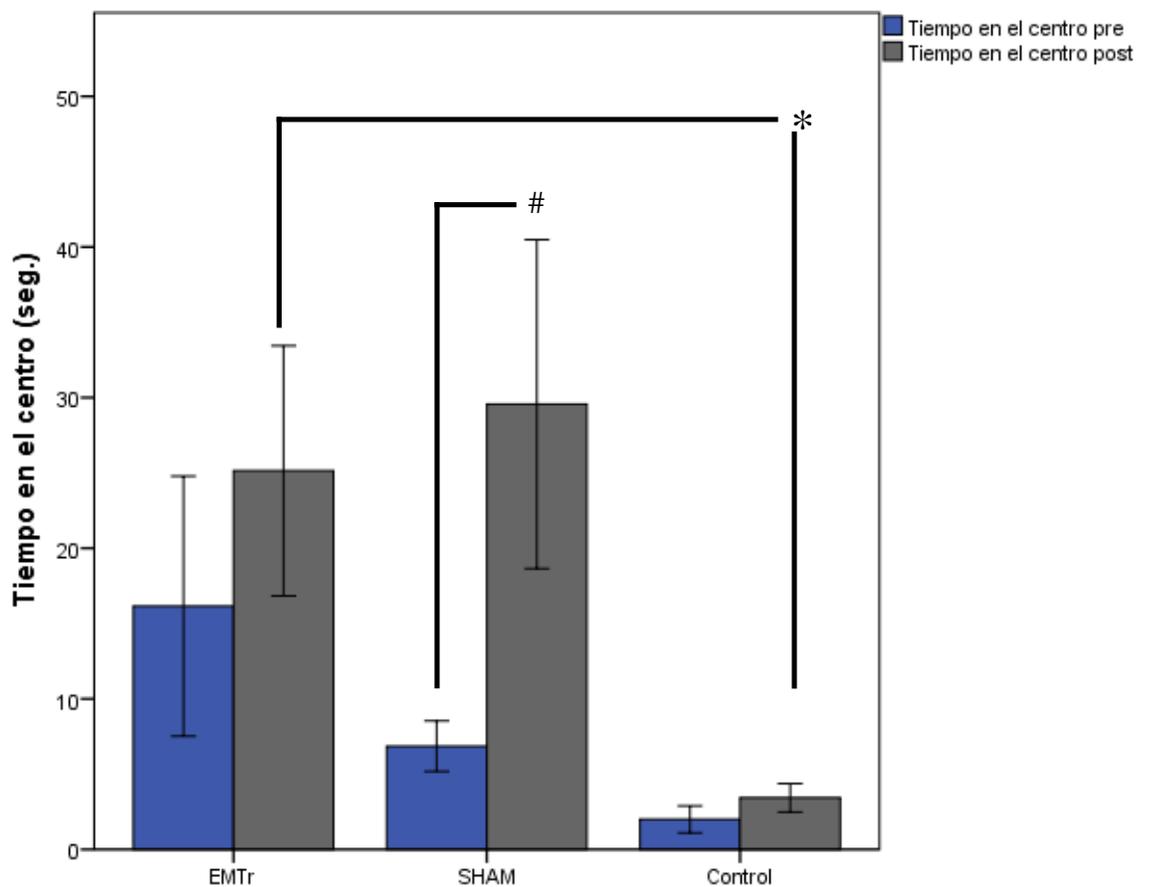


Figura 6. Tiempo promedio que los animales estuvieron en el centro. Se puede percibir un aumento significativo en el promedio después de aplicada la estimulación.

3) Prueba de rotarod

Los grupos EMTr y SHAM tardan menos en caerse del rotarod si se compara con el grupo Control antes de la estimulación ($p=0.002$). Este resultado se esperaba debido a que la lesión por 6-OHDA afecta la movilidad y equilibrio de las ratas lesionadas. Cuando se hace la misma comparación después de la estimulación, los resultados siguen dando una diferencia estadísticamente significativa SHAM vs Control ($p = 0.004$). Cuando se hace la comparación EMTr vs Control el resultado es limítrofe ($p = 0.055$) lo que indica que sí hubo una mejora en la latencia a la caída. No se detectaron diferencias antes y después de la EMTr en el grupo SHAM. Por otro lado, los grupos Control y EMTr sí reportaron cambios. El grupo control disminuyó su latencia a la caída de forma significativa ($p = 0.028$), mientras que el grupo EMTr la aumentó ($p = 0.046$) (figura 7).

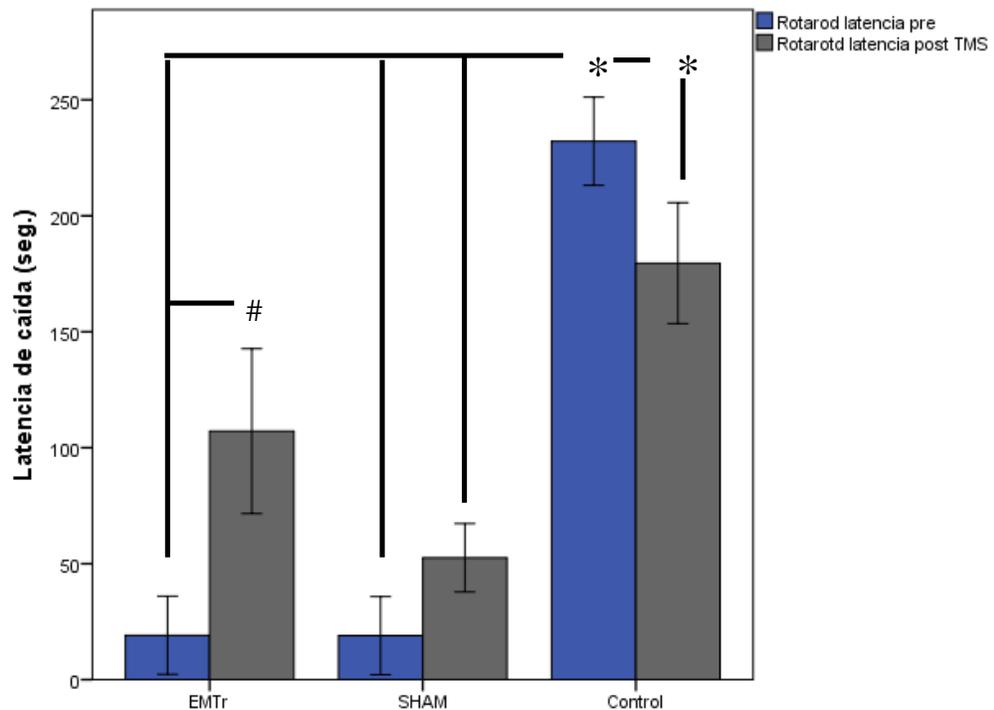


Figura 7. Latencia a la primera caída. Se puede observar una recuperación del grupo estimulado después de recibir el tratamiento en comparación al grupo Control.

Se encontró una diferencia significativa en el promedio de velocidad máxima alcanzada antes de la estimulación en el grupo EMTr en comparación al Control ($p=0.026$). Se detectó una ligera recuperación significativa en este mismo grupo después de ser estimulado ($p=0.047$); también el grupo SHAM disminuyó su promedio de forma significativa ($p=0.025$) en comparación al Control (gráfica 8).

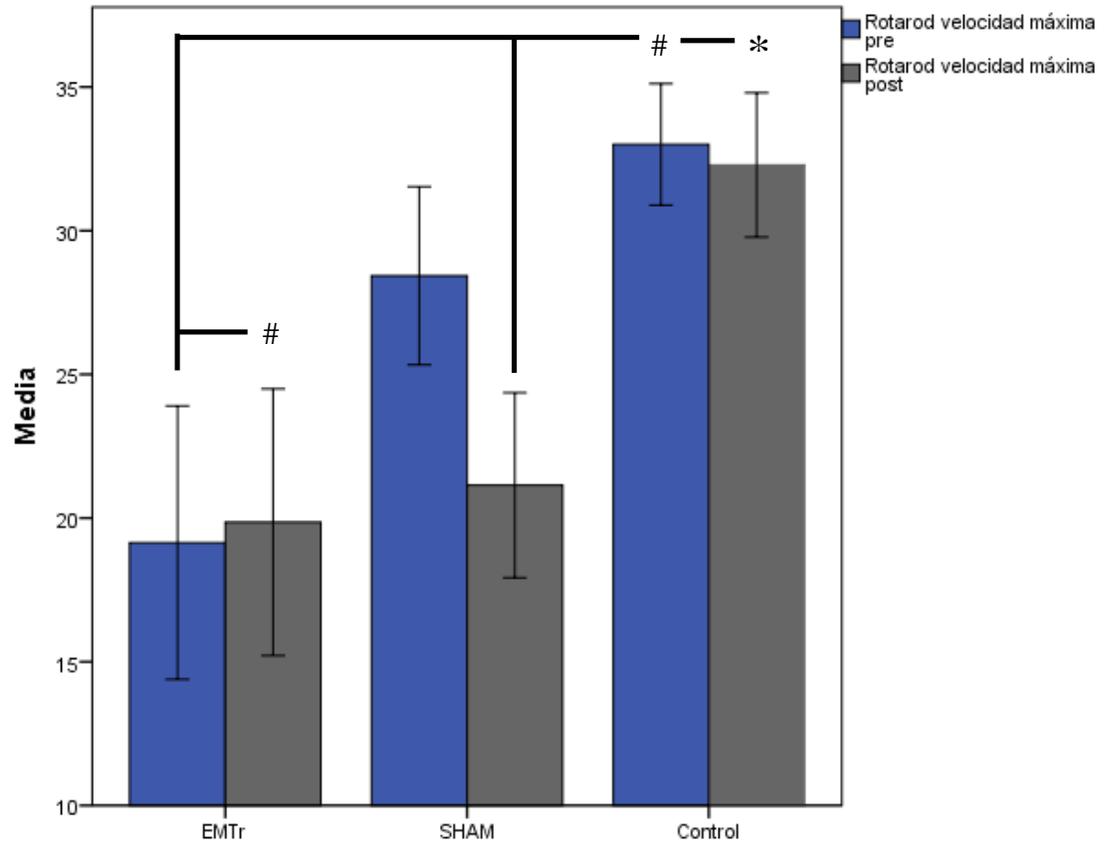


Figura 8. Promedio de velocidad máxima alcanzada. Se observa una disminución en el promedio de las ratas SHAM y una ligera recuperación del grupo EMTr.

En la figura 9 se puede observar el promedio de caídas de cada grupo. Como se esperaba, los grupos EMTr y SHAM presentan un mayor porcentaje de caídas en comparación al Control quien realizó la prueba de forma perfecta ($p = 0.017$ y $p=0.002$, respectivamente). Después del tratamiento los grupos señalados disminuyeron el número de caídas significativamente si se compara con su desempeño anterior ($p = 0.026$ y $p = 0.002$).

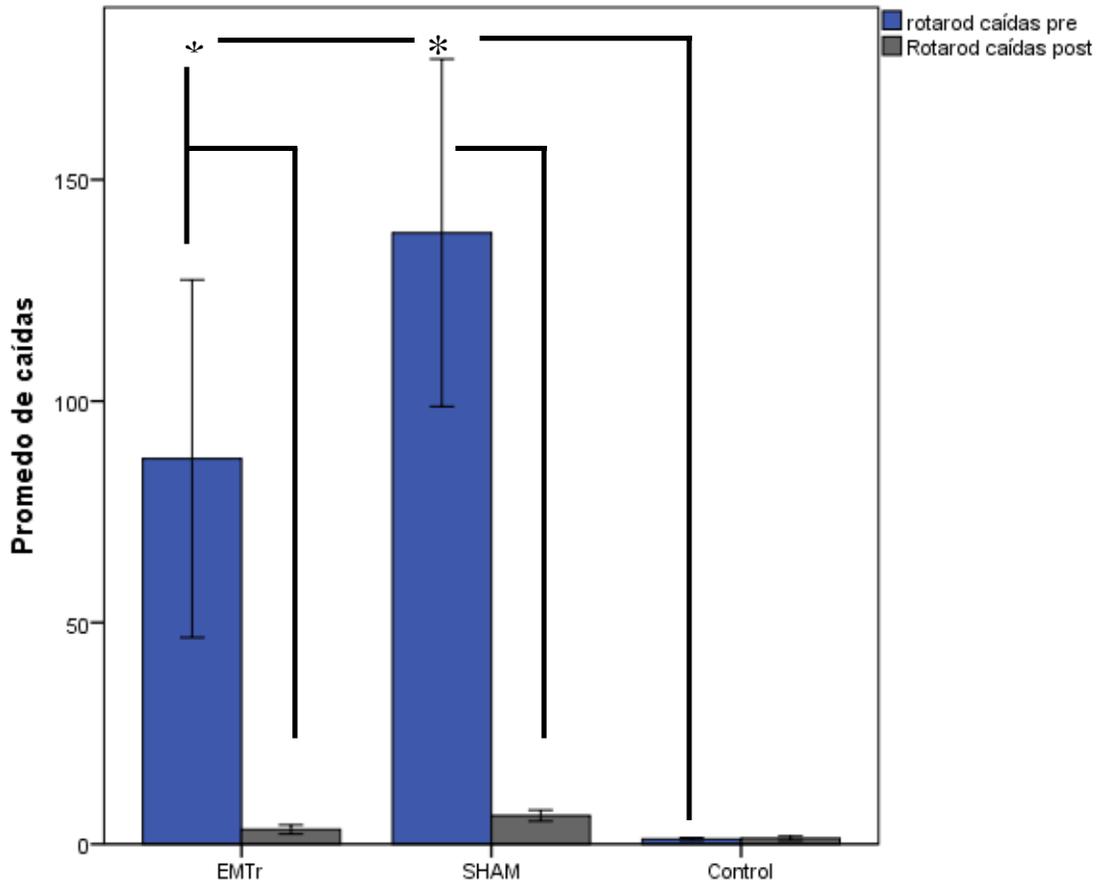


Figura 9. Promedio de caídas. El grupo EMTr y SHAM disminuyeron el promedio de caídas presentadas en la prueba de manera significativa.

Discusión

El presente estudio se diseñó para probar la efectividad de la Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva sobre la sintomatología motora provocada por la lesión con 6-OHDA de la vía cortico-estriatal en ratas adultas. Los resultados muestran que la 6-OHDA indujo signos relacionados con la enfermedad de Parkinson como es la rigidez y la bradicinesia. El empleo semicrónico de la EMTr provocó una recuperación en la actividad motora. Estos resultados pueden ser considerados para el empleo de manera sistemática en la clínica.

Técnicas como L-DOPA presentan inconvenientes a largo plazo que pueden afectar el bienestar de los pacientes que la usan, incluso peor que los síntomas de la EP (Deurwaerdère, Di, & Millan, 2017). Técnicas como la *Deep Brain Stimulation* pueden ser muy eficaces contra esta enfermedad, con el inconveniente de ser una técnica invasiva y que suele estar reservada para pacientes con estados de la enfermedad muy avanzados (Herrington, 2016). Por ese motivo la EMTr es una gran opción que puede ser empleada no sólo contra los síntomas de la EP, también en las primeras fases de la enfermedad.

El grupo estimulado tuvo una recuperación dramática de su desempeño en las pruebas conductuales. La EMTr ha mostrados ser un tratamiento prometedor para los animales con 6-OHDA (Cho, 2013). Aunque en este trabajo la estimulación se aplicó a 10 Hz por 20 días. Un estudio realizado en el 2010 por Yang, experimentó con la EMTr a 0.5 Hz y concluyó que la estimulación tenía efectos protectores contra la denervación de DA en la SNpc (Yang, 2010); aunque ligan estos resultados con un posible efecto antioxidante producido por la estimulación, nosotros, por otro lado, creemos que los efectos positivos de la estimulación pueden deberse a efectos neuromoduladores y de neurogénesis. Como se puede observar, existe evidencia contradictoria que impide llegar a un consenso sobre los parámetros donde la EMTr es más efectiva. Este trabajo abona a la idea de que la estimulación a alta frecuencia es más eficaz como tratamiento no invasivo contra la EP.

La disminución observada en el uso del miembro izquierdo por parte del grupo SHAm en la prueba del cilindro, puede deberse al efecto continuo de la neurotoxina. Después de las sesiones de estimulación estos resultados se invierten y los animales aumentan el uso de dicho miembro. Esta aparente recuperación puede deberse a mecanismos compensatorios que el cerebro desencadena para llegar a un estado de homeostasis. En contraste, el grupo estimulado no tuvo una recuperación significativa del miembro izquierdo, aunque sí hubo una recuperación progresiva. La duda que surge es si esta recuperación puede verse beneficiada si se cambian los parámetros de estimulación o el tiempo de observación.

La conducta registrada en la prueba de campo abierto hace pensar que los animales lesionados presentan mayor conducta tipo ansiosa que los animales control. No se han encontrado datos que demuestren un efecto ansiolítico de la 6-OHDA; sin embargo, la denervación de las neuronas dopaminérgicas puede tener relación con lo encontrado. Un mecanismo que se cree puede estar detrás de la recuperación de los animales lesionados es la liberación de BDNF. Es bien sabido que la EMTr produce aumento en los niveles de esta proteína (Wang et al., 2012), y algunos autores han propuesto que puede estar implicada en los efectos positivos de esta técnica (Brunoni, Sergio, & Fregni, 2008; Tang, Thickbroom, & Rodger, 2015; Shang et al., 2016).

Por otro lado, diferentes mecanismos epigenéticos pueden estar implicados en los efectos positivos de la EMTr. Se demostró que la EMTr a alta frecuencia produce cambios en las histonas de los ratones estimulados (Etiévant, Manta, Laptay, & Magno, 2015). Curiosamente, este mismo grupo demostró que los receptores a dopamina D2 tienen un papel importante en estos mecanismos epigenéticos. Keck y su grupo de investigación (2002) demostró que si se emplea esta técnica de rehabilitación a 20 Hz (alta frecuencia) en ratas Wistar mejora la liberación de DA en zonas mesolímbicas, posiblemente por la activación de la ruta A9 que conecta con la VTA. Estos datos toman cierta relevancia si se les liga con lo reportado por Parcual-Leone et al. (1996), quien encontró la eficacia de la EMTr contra la depresión mayor resistente a fármacos.

En este trabajo se propone que la EMTr en animales lesionados con 6-OHDA puede estar activando el grupo A9, estimulando de forma indirecta la VTA y produciendo un incremento en los niveles de DA ¿Por qué el grupo EMTr no mejoró en el uso del miembro contralateral? Probablemente la lesión en estos animales es tan severa que es más difícil recuperar los niveles basales. La estimulación de A9 genera un aumento de DA en el lado no lesionado lo que explicaría el aumento de uso del miembro derecho por parte del grupo EMTr que en algunas pruebas era mayor que el grupo control. Por si fuera poco, la estimulación en la zona M1 puede promover la liberación de la proteína BDNF, la cual actuaría como neuroprotectora contra el avance de la lesión producida por la neurotoxina. Sin embargo, se carece de evidencia molecular o histológica. La siguiente fase de esta investigación será corroborar lo anteriormente dicho con el apoyo de técnicas moleculares.

Para futuros experimentos, podría hacerse uso de pruebas conductuales que reportan de forma más precisa el daño inducido por la 6-OHDA, así como la recuperación promovida por la EMTr. Diferentes autores utilizan la prueba de giro espontáneo e inducido para ver el nivel de neurodegeneración causado por la 6-OHDA (Boix et al., 2015; Drucker-colin et al., 1996). El giro espontáneo consiste en contabilizar el número de giros que da la rata en un período de 15 minutos. Al final se promedia el número de giros del lado contrario a la lesión. Por otro lado, el giro inducido puede dividirse en dos: por amfetamina y por apomorfina. En ambos casos se inyecta a los animales una dosis promedio de 2.5 mg/kg de amfetamina y 0.20 mg/kg de apomorfina vía intra peritoneal, y se cuenta el número de giros realizados en un periodo de 40-90 min. La inyección de amfetamina permite evaluar la recuperación de los niveles de DA en el lado lesionado debido a que esta droga aumenta la liberación de DA. La apomorfina, por otro lado, sirve para ver el nivel de daño de los animales producido por la toxina (Paola et al., 2017). También es necesario experimentar con diferentes parámetros de estimulación para ver si los animales con lesión por 6-OHDA tienen una mejora más significativa y en menor tiempo

Conclusiones

Los resultados observados permiten afirmar que la EMTr tiene efectos benéficos en animales lesionados por 6-OHDA. Los animales sometidos a la inyección de 6-OHDA vía estereotáxica presentaron los síntomas característicos (Decressac et al., 2012).

La Enfermedad de Parkinson es un mal que afecta a nivel mundial a un 1% de la población mundial. Hacen falta muchos años para entender qué factores están detrás de su aparición y usar esa información para una posible prevención de la enfermedad. Es necesario perfeccionar técnicas que ayuden a las personas que sufren de esta enfermedad a tener una mejor calidad de vida o, incluso, eliminar los síntomas más negativos. Es por eso que diferentes terapias han sido desarrolladas a lo largo de los años. Sin embargo, los efectos secundarios de algunas de ellas (L-DOPA) o lo invasivas que pueden ser (DBS) hace sustancial la investigación de técnicas más eficaces.

La Estimulación Magnética Transcraneal repetitiva se alza como un método no invasivo y eficaz contra la EP. Este trabajo se inserta dentro de la evidencia científica que apoya el uso de la EMTr como método eficaz contra algunos de los síntomas característicos del Parkinson. El modelo de 6-OHDA nos permitió observar que las ratas Wistar con estimulación presentaban una mejora significativa en las pruebas conductuales que se les aplicó. Se tiene la hipótesis de que la EMTr puede estar estimulando el grupo A9 lo que produce un aumento en la liberación de DA en el lado no lesionado de los animales expuestos a la 6-OHDA. Además, creemos que los efectos protectores de la estimulación pueden deberse a un incremento en la expresión de la proteína BDNF. El objetivo de los próximos experimentos será descartar o aceptar, con métodos moleculares, las hipótesis antes mencionadas.

Referencias

- Alicia, C., Martínez, C. De, Mrad, A., Martínez, C., & Rodriguez, C. E. (n.d.). EL ANIMAL COMO SUJETO EXPERIMENTAL ASPECTOS TÉCNICOS Y ÉTICOS.
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson ' s disease : risk factors and prevention.
- Bioética, R. C. De. (2006). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=189217283010>.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Michallon, C. H. U., Pa, B., & Cedex, G. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA , dopamine and MPTP : contribution to the apoptotic theory in Parkinson ' s disease, *65*, 135–172.
- Boix, J., Padel, T., & Paul, G. (2015). A partial lesion model of Parkinson's disease in mice - Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behavioural Brain Research*, *284*, 196–206.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.053>
- Bové, J., Perier, C., Diseases, N., & Re-, V. H. (2012). NEUROTOXIN-BASED MODELS OF PARKINSON ' S DISEASE, *211*, 51–76.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Brunoni, A. R., Sergio, P., & Fregni, F. (2008). Can the “ yin and yang ” BDNF hypothesis be used to predict the effects of rTMS treatment in neuropsychiatry ?, 279–282. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.02.011>
- Campdelacreu, J. (2014). Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer: Factores de riesgo ambientales. *Neurologia*, *29*(9), 541–549.
<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.04.001>
- Camprodón, J. A. (2014). *Integración de la estimulación magnética transcraneal con técnicas de neuroimagen. Estimulación magnética transcraneal y neuro-modulación*. Elsevier España#241;a, S.L. <https://doi.org/10.1016/B978-84->

- Cannon, J. R., & Å, J. T. G. (2010). *Neurotoxic in vivo models of Parkinson ' s disease : recent advances*. *Progress In Brain Research- Volume 184* (Vol. 184). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)84002-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)84002-6)
- Chihuailaf, R.; Contreras, P. A.; Wittwer, F. G. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*, 33(3), 265–283.
- Clares, A. R. B. (2017). Revista Clínica Española Aplicación clínica de las terapias con células , genes y tejidos en España , (xx).
- Costa, C., & Comabella, M. (2012). ´ lulas madre Tratamiento de enfermedades neuroló, 139(5), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2011.12.009>
- Costantini, L. C., & Isacson, O. (2000). Immunophilin ligands and GDNF enhance neurite branching or elongation from developing dopamine neurons in culture. *Experimental Neurology*, 164(1), 60–70. <https://doi.org/10.1006/exn>
- Dandekar, M. P., Luse, D., Hoffmann, C., Cotton, P., Peery, T., Ruiz, C., ... Fenoy, A. J. (2017). Increased dopamine receptor expression and anti-depressant response following deep brain stimulation of the medial forebrain bundle. *Journal of Affective Disorders*, 217(March), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.03.074>
- Decressac, M., Mattsson, B., & Björklund, A. (2012). Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 235(1), 306–315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.02.012>
- Deng, H.-X., Shi, Y., Yang, Y., Ahmeti, K. B., Miller, N., Huang, C., ... Siddique, T. (2016). Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson's disease. *Nat Genet*, advance on(7), 733–739. <https://doi.org/10.1038/ng.3589>
- Deurwaerdère, P. De, Di, G., & Millan, M. J. (2017). Progress in Neurobiology Expanding the repertoire of L-DOPA ' s actions : A comprehensive review of its

functional neurochemistry, *151*, 57–100.

Drucker-colin, R., Dur, A., Salfn-pascual, R. J., Verdugo-diaz, L., Mendoza-ramirez, J. L., & Jimnez-anguiano, A. (1996). Rapid eye movement (REM) sleep deprivation in 6-OHDA nigro-striatal lesioned rats with and without transplants of dissociated chromaffin cells, *729*, 170–175.

Etiévant, A., Manta, S., Latapy, C., & Magno, L. A. V. (n.d.). Repetitive transcranial magnetic stimulation induces long-lasting changes in protein expression and histone acetylation. *Nature Publishing Group*, 1–9.
<https://doi.org/10.1038/srep16873>

Fibiger, H. C. (1993). Mesolimbic dopamine: an analysis of its role in motivated behavior, *5*, 321–327.

Gasca-salas, C., Obeso, N., Cinac, H. M., Universitario, H., & Puerta, H. M. (2016). DE PARKINSON PARKINSON'S DISEASE: A REVIEW, *27*(3), 363–379.

Gittis, A. H., & Kreitzer, A. C. (2012). Striatal microcircuitry and movement disorders. *Trends in Neurosciences*, *35*(9), 557–564.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.008>

Gubellini, P., Salin, P., Kerkerian-Le Goff, L., & Baunez, C. (2009). Deep brain stimulation in neurological diseases and experimental models: From molecule to complex behavior. *Progress in Neurobiology*, *89*(1), 79–123.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.06.003>

Ibanez, L., Dube, U., Budde, J., Black, K., Medvedeva, A., Davis, A. A., ... Cruchaga, C. (2017). TMEM230 in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *56*, 212.e1-212.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.014>

Jordán, J., Solesio, M. E., & Galindo, M. F. (n.d.). *Mitochondrial Alterations and Mitophagy in Response to 6-Hydroxydopamine*. *Autophagy* (Fourth Edition, Vol. 4). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405528-5.00013-4>

Keck, M. E., Welt, T., Mu, M. B., Erhardt, A., Ohl, F., Toschi, N., ... Sillaber, I. (2002). Repetitive transcranial magnetic stimulation increases the release of

dopamine in the mesolimbic and mesostriatal system, *43*, 101–109.

Langevin, J., Salles, A. A. F. De, Kosoyan, H. P., & Krahl, S. E. (2010). Deep brain stimulation of the amygdala alleviates post-traumatic stress disorder symptoms in a rat model. *Journal of Psychiatric Research*, *44*(16), 1241–1245. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.04.022>

Lefaucheur, J., André-obadia, N., Antal, A., Ayache, S. S., Baeken, C., Benninger, D. H., ... Garcia-larrea, L. (2014). Clinical Neurophysiology Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS), *125*, 2150–2206.

Lindo, E. (2017). Roald Dahl: cuentos Completos (I). Penguin Random House, México.

Marchese, D., Botta-orfila, T., Cirillo, D., Rodriguez, A., Livi, C. M., Ezquerra, M., ... Tartaglia, G. G. (2018). Discovering the 3 UTR-mediated regulation of alpha-synuclein, *45*(22), 12888–12903. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1048>

Mart, A., & Ramos, M. (n.d.). “ Maduración derivadas y de funcionalidad células de neuronas neurales dopaminérgicas humanas de, 1–206.

Martínez-Martín, P., Hernández, B., Ricart, J., Alegre, V. B., Lasaosa, S. S., Martínez, I. M., ... Fleta, F. G. (2014). Factores determinantes del inicio de tratamiento con levodopa/carbidopa/entacapona en pacientes españoles con enfermedad de Parkinson. *Neurología*, *29*(3), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.008>

Martínez, C. D., Vargas, C. R., & Arancibia, S. R. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración, *46*(6), 229–235.

Meamar, R., Javadirad, S. M., Chitsaz, N., Asadian Ghahfarokhi, M., Kazemi, M., & Ostadsharif, M. (2016). Vitamin D receptor gene variants in Parkinson's disease patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, *18*(3), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2016.08.004>

- Medina, F. J., Pascual, Á., & Túnez, I. (n.d.). Mecanismos de acción en la estimulación magnética transcraneal, 21–30.
- Monville, C., Torres, E. M., & Dunnett, S. B. (2006). Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model, *158*, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.06.001>
- Neggers, S. F. W., Petrov, P. I., Mandija, S., & Sommer, I. E. C. (n.d.). Sebastiaan F.W. Neggers * ,1 , Petar I. Petrov * , Stefano Mandija † , Iris E.C. Sommer * , Nico A.T. van den Berg { * , 222.
- Paola, J., Arzuza, A., Julieth, A., Arciniegas, B., Reyes, L. M. D. E. L. O. S., & Turner, L. F. (2017). EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL DEL TRASPLANTE DE hMSC-GFP + EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE HEMIPARKINSON EN RATA WISTAR Behavioral Evaluation of hMSC-GFP + Transplantation in an Hemiparkinson Experimental Model in Wistar Rat, *22*(2), 127–136.
- Pascual-leone, A., Rubio, B., Pallardó, F., & Catalá, M. D. (1996). Early report Rapid-rate transcranial magnetic stimulation of left dorsolateral prefrontal cortex in drug-resistant depression, *348*, 233–237.
- Peña Llamas, E., Fernández García, C., & Fernández Blázquez, M. A. (2010). Parkinsonismo farmacológico frente a demencia con cuerpos de Lewy. *Neurología*, *25*(7), 459–461. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2009.12.007>
- Prensa, L., & Parent, A. (1999). La organización compartimental del estriado humano, *28*(5), 512–519.
- Ruiz, M. L., Sarasa, M. L. R., Rodríguez, L. S., Ristol, E. G., & Arce, S. A. (2016). ARTICLE IN PRESS Evidencias actuales sobre la estimulación magnética neurorehabilitación postictus : Ampliando horizontes. *Neurología*. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.03.008>
- Santana, M., Palmér, T., Simplício, H., Fuentes, R., & Petersson, P. (2015). Characterization of long-term motor deficits in the 6-OHDA model of Parkinson's

- disease in the common marmoset. *Behavioural Brain Research*, 290, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.037>
- Secretaría de Salud. (2010). Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención, 95.
- Shang, Y., Wang, X., Shang, X., Zhang, H., Liu, Z., Yin, T., & Zhang, T. (2016a). Neurobiology of Learning and Memory Repetitive transcranial magnetic stimulation effectively facilitates spatial cognition and synaptic plasticity associated with increasing the levels of BDNF and synaptic proteins in Wistar rats, 134, 369–378.
- Shang, Y., Wang, X., Shang, X., Zhang, H., Liu, Z., Yin, T., & Zhang, T. (2016b). Neurobiology of Learning and Memory Repetitive transcranial magnetic stimulation effectively facilitates spatial cognition and synaptic plasticity associated with increasing the levels of BDNF and synaptic proteins in Wistar rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.08.016>
- Shen, L., & Ji, H.-F. (2015). Associations between Vitamin D Status, Supplementation, Outdoor Work and Risk of Parkinson's Disease: A Meta-Analysis Assessment. *Nutrients*, 7(6), 4817–27. <https://doi.org/10.3390/nu7064817>
- Stefani, A., Trendafilov, V., Liguori, C., Fedele, E., & Galati, S. (2017). Subthalamic nucleus deep brain stimulation on motor-symptoms of Parkinson's disease: Focus on neurochemistry. *Progress in Neurobiology*, 151, 157–174. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.01.003>
- Tang, A., Thickbroom, G., & Rodger, J. (2015). Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation of the Brain : Mechanisms from Animal and Experimental Models. <https://doi.org/10.1177/1073858415618897>
- Toro, J. (2010). Demencia con cuerpos de Lewy. *Acta Neurol Colomb*, 26(S3:1), 78–80. Retrieved from http://www.acnweb.org/acta/acta_2010_26_Supl3_1_78-80.pdf

Verdugo-díaz, L., & Drucker-colin, R. (2014). Campos magnéticos : usos en la biología y la medicina, 1–19.

Wang, H., Crupi, D., Liu, J., Stucky, A., Cruciata, G., Rocco, A. Di, ... Ghilardi, M. F. (2012). NIH Public Access, 31(30), 11044–11054.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2125-11.2011.rTMS>

Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D., Mandel, J., Wirdefeldt, K., ... Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*, 26, 1–58.
<https://doi.org/10.1007/s10654-011-9581-6>