



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE HEMIPLEJÍA EN LA RATA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA:

RIGOBERTO GONZÁLEZ PIÑA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MVS

DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL.
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MVS

DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MVS.

MÉXICO D.F. AGOSTO, 2013



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.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco el valioso apoyo de los siguientes colegas y amigos:

Dr. Fructuoso Ayala Guerrero, por aceptar ser mi tutor académico y realizar comentarios desde la elaboración del proyecto hasta esta tesis.

M. en C. Antonio Bueno Nava y M. en C. Alberto Ávila Luna por su valiosa asistencia durante las cirugías, registros conductuales y procesamiento de tejidos para análisis cromatográfico, lo que representó muchas horas de trabajo exhaustivo. Muchas gracias por su apoyo.

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda por su apoyo logístico consistente en el préstamo de los equipos del Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS y su apoyo académico al realizar comentarios tanto al proyecto como a la tesis

Dr. Sergio Montes López por el tiempo invertido en la capacitación de los alumnos en el uso de las técnicas cromatográficas para habilitarlos asistiendome en este trabajo.

A cada uno de los miembros del Comité Tutoral: Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca, Dr. Abel Santamaría del Ángel, Dra. Francisca Pérez Severiano y Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez por sus valiosos comentarios que enriquecieron la calidad del trabajo.

Al Instituto Nacional de Rehabilitación por las facilidades otorgadas en la obtención del grado académico

Un agradecimiento especial a la Lic. Gabriela Ruiz Díaz y a la Srita. Jasshel Isui Gutiérrez Herrada por su invaluable apoyo en la estructuración del manuscrito.

INDICE.

RESUMEN.....	6
CAPÍTULO I. PLASTICIDAD CEREBRAL.....	8
BASES NEUROPSICOLÓGICAS DE LA PLASTICIDAD CEREBRAL.....	8
1.1 LESIONES PERIFÉRICAS.....	8
1.2 LESIONES CENTRALES.....	9
MECANISMOS PSICOPATOLÓGICOS SUBYACENTES A LA PLASTICIDAD CEREBRAL.....	9
2.1 NIVEL MICROSCÓPICO.....	9
2.2 NEUROGÉNESIS.....	11
NIVEL MACROSCÓPICO.....	12
3.1 DIASQUISIS.....	12
3.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE MASAS.....	12
3.3 PLASTICIDAD MODAL CRUZADA.....	13
PLASTICIDAD NATURAL EN HUMANOS.....	13
PERSPECTIVAS TERAPEUTICAS BASADAS EN LA PLASTICIDAD CEREBRAL.....	14
CAPÍTULO II. RECUPERACIÓN FUNCIONAL DESPUÉS DEL DAÑO CORTICAL.....	16
1.1 PRIMERAS DEMOSTRACIONES ACERCA DE LA PLASTICIDAD CEREBRAL DESPUÉS DEL DAÑO.....	16
1.2 NUEVOS PUNTOS DE VISTA EN CUANTO A LOS MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES SUBYACENTES A LA REORGANIZACIÓN SOMATOTÓPICA. ...	16
1.3 EVENTOS DE PLASTICIDAD REMOTA INDUCIDA POR EL DAÑO CORTICAL. .	17
1.4 PRINCIPIO DE ACCIÓN DE MASAS.....	19
1.5 PLASTICIDAD Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL DESPUÉS DEL DAÑO.....	19
1.6 DIASQUISIS.....	19

CAPÍTULO III. FARMACOLOGÍA DE LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL	21
1. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS EN ANIMALES.	21
1.1 POSIBLES MECANISMOS DE RECUPERACIÓN FUNCIONAL MODULADA POR LOS NEUROTRANSMISORES.	24
2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS DESPUÉS DEL DAÑO CEREBRAL EN EL HOMBRE.	29
CAPÍTULO IV. RELACIONES ANATÓMICAS ENTRE LA CORTEZA CEREBRAL, EL PUENTE Y EL CEREBELO.	34
1. LOCUS CERULEUS.	34
2. CONEXIÓN CEREBRO- CEREBELAR.	35
3. AFERENCIAS.	36
4. FIBRAS NORADRENÉRGICAS.	37
5. ACCIÓN DE LA NORADRENALINA.	39
CAPÍTULO V. EFECTOS DE LA LESIÓN CEREBRAL EN LA CORTEZA MOTORA EN EL MODELO DE HEMIPLEJIA EXPERIMENTAL.	40
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	42
HIPÓTESIS:	42
OBJETIVOS:	42
I. CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUELAS MOTORAS DESPUÉS DE LA ABLACIÓN CORTICAL MOTORA Y CONTENIDO DE NORADRENALINA EN PUENTE Y CEREBELO.	43
REGISTROS CONDUCTUALES ADICIONALES.	45
II. CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUELAS MOTORAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DE $FeCl_2$ EN LA CORTEZA MOTORA Y CONTENIDO DE NORADRENALINA EN PUENTE Y CEREBELO.	47
ANÁLISIS BIOQUÍMICO ADICIONAL: PRODUCTOS LÍPIDICOS FLUORESCENTES.	49

RESULTADOS.....	51
I. EFECTOS DE LA ABLACIÓN CORTICAL MOTORA Y SOBRE EL DÉFICIT MOTOR, SOMATOSENSORIAL, EL LARGO, ANCHO, ÁNGULO DE LA ZANCADA Y CONTENIDO DE NORADRENALINA EN PUENTE Y CEREBELO.....	51
II. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPARÉNQUIMAL DE $FeCl_2$ SOBRE EL DÉFICIT MOTOR EVALUADO CON LA VIGA DE EQUILIBRIO, EL LARGO, ANCHO, ÁNGULO DE LA ZANCADA Y CONTENIDO DE NORADRENALINA EN PUENTE Y CEREBELO.....	55
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:.....	61
I. MODELO DE LESIÓN CORTICAL AGUDA INDUCIDO POR ABLACIÓN.....	61
II. MODELO DE LESIÓN CORTICAL CRÓNICA INDUCIDA POR INYECCIÓN INTRAPARÉNQUIMAL DE $FeCl_2$	64
III. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS TIPOS DE LESIÓN.....	66
REFERENCIAS.....	70
ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO.....	99

RESUMEN

Los mecanismos de recuperación funcional después del daño cerebral motor están poco entendidos. Se ha discutido que tanto las lesiones cerebrales agudas como las crónicas involucran diferentes patrones de reorganización. En este trabajo se caracterizaron los efectos de una lesión aguda (ablación cortical) y una lesión crónica inducida con cloruro ferroso (FeCl_2) sobre la conducta motora y en el contenido total de noradrenalina (NA) a nivel pontino y cerebelar, ya que este neurotransmisor ha sido involucrado en la recuperación funcional.

Se utilizaron 71 ratas macho Wistar (280-320 g) distribuidas en seis grupos: Sham A (SA), Sham B (SB) lesionadas por ablación cortical (AC), recuperadas después de la ablación cortical (RAC), lesionadas por inyección intraparenquimal de FeCl_2 dentro de la corteza motora (Fe) y recuperadas después de la lesión por Fe (RFe). Después de un registro basal de la marcha, las ratas AC ($N = 6$) y RAC ($n = 12$) fueron lesionadas por ablación de la corteza motora (MCx), mientras que al grupo SA ($n = 11$) se le dejó intacta. Posteriormente la marcha se registró cada 6 h durante 48 h. También se realizaron evaluaciones sensorio-motoras adicionales para estudiar las secuelas tempranas. A los animales restantes se les fijó una cánula guía dirigida a la MCx y al grupo SB ($n = 16$) se le inyectó líquido cefalorraquídeo artificial (LCFR, $5\mu\text{L}$), mientras que los grupos Fe ($n = 10$) y RFe ($n = 16$) recibieron LCFR conteniendo FeCl_2 (50mM). Se registró la marcha cada 24 h durante 20 días y adicionalmente se realizaron evaluaciones conductuales paralelas mediante el paradigma de la viga de equilibrio para evaluar las secuelas tardías. El contenido de NA se extrajo tanto de los hemisferios cerebelares como de ambos lados del puente y se midió por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las comparaciones conductuales se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney ($p = 0.05$) y las de NA mediante un ANOVA simple ($p=0.05$).

Los resultados mostraron que la recuperación fue más rápida en los animales con lesión aguda que en las ratas con lesión crónica. También se observó incremento de NA pontina en los animales del grupo AC y un decremento de este neurotransmisor en el grupo Fe encontrándose niveles normales de NA en las ratas recuperadas del daño.

La NA cerebelar no se alteró en el grupo AC mientras que en los animales Fe disminuyó. El grupo de animales RFe mostró niveles de NA similares al los del SB. Estos resultados demuestran que los mecanismos noradrenérgicos involucrados en la recuperación después del daño cerebral dependen del tipo de lesión, sugiriendo la necesidad de considerar la naturaleza del daño cuando se implementa el tratamiento de las secuelas en seres humanos.

CAPÍTULO I. PLASTICIDAD CEREBRAL

Durante mucho tiempo se creyó que la organización funcional cerebral es estática, a pesar de los estudios y descripciones realizados a partir de pacientes rehabilitados después de sufrir alguna lesión cerebral (Payne y Lomber, 2001). Sin embargo, al seguir estudiando las áreas corticales y subcorticales en momentos críticos de la recuperación después del daño cerebral, se ha reconsiderado la postura anterior. Se han llevado a cabo muchas investigaciones, inicialmente en animales y después en humanos mediante estudios de neuroimagen no invasivos, para estudiar este mecanismo subyacente de compensación. Fue así como nació el concepto de plasticidad cerebral.

Duffau (2005) define a la plasticidad cerebral como un proceso continuo de remodelación a corto, mediano y largo plazo de los mapas sinápticos del cerebro, para optimizar el funcionamiento de la red neuronal.

La plasticidad cerebral tiene un papel importante durante la filogénesis, la ontogénesis con la elaboración de nuevos circuitos que inducen el aprendizaje y mantiene las redes neuronales en adultos mayores (Hedden y Gabrieli, 2004), todos son procesos plásticos a los que en conjunto se les define como Plasticidad Natural (Hertz-Pannier, 1999). También existen procesos plásticos después del daño en el sistema nervioso central o periférico con la reorganización funcional subyacente, parcial o total, que se conoce como plasticidad post-lesión (Xerri, 1998).

BASES NEUROPSICOLÓGICAS DE LA PLASTICIDAD CEREBRAL

1.1 LESIONES PERIFÉRICAS

El mapa somatosensorial es reorganizado cuando existe una lesión a nivel periférico. El área cortical que corresponde al receptor cutáneo lesionado se vuelve sensible a los estímulos de áreas cutáneas adyacentes. Esta reorganización puede ser reversible, estable por algunas horas o incluso verse fortalecida por remodelaciones adicionales durante los siguientes meses (Xerri, 1998; Merzenich y Jenkins 1993). Este fenómeno

ha sido observado en la corteza motora primaria después de la lesión de nervios periféricos (Buonomano y Merzenich, 1998; Sanes y Donoghue, 2000).

1.2 LESIONES CENTRALES

Después de lesiones corticales en el área primaria somatosensorial, se ha demostrado una redistribución del mapa somatotópico tanto en las áreas próximas a la lesión como en regiones remotas (Jenkins y Merzenich, 1987). Se ha reportado lo mismo para las funciones motoras (Nudo y cols., 1996a, 1996b). Otros estudios han mostrado que la adquisición de habilidades puede modular la representación de los mapas motores y la ampliación de la representación cortical depende del aprendizaje en específico (Kossut y Siucinska, 1998). Entrenamiento tal como la rehabilitación, puede formar parte de la reorganización de la corteza adyacente y jugar un papel importante en la recuperación motora (Nudo y cols., 1996b).

MECANISMOS PSICOPATOLÓGICOS SUBYACENTES A LA PLASTICIDAD CEREBRAL

2.1 NIVEL MICROSCÓPICO

La plasticidad natural se observa en diferentes etapas: durante la cito e histogénesis colabora en la elaboración y proliferación de ramas dendríticas y axonales; aparece también en la formación de sinapsis, diferenciación celular y organización de los circuitos neuronales. Esta remodelación incrementa la especificidad de cada circuito y el potencial plástico de cada sistema (Holmes y McCabe, 2001).

La sinapsis no debe considerarse una conexión estática sino dinámica con propiedades plásticas (Byrne, 1997) que dirige a un replanteamiento del mapa funcional a nivel macroscópico (Buonomano y Merzenich, 1998; Foeller y Feldman, 2004). Dicha plasticidad está involucrada en la formación de la memoria y el almacenamiento de información (Martin y cols., 2000). Tal proceso permite un control dinámico del flujo de información dentro de las redes neuronales y explica los siguientes fenómenos:

- Potenciación a largo plazo; que es un incremento en la potencia de la sinapsis inducido por estimulación simultánea de dos o más neuronas, mediante estímulos breves de alta frecuencia, este mecanismo se ha demostrado en el hipocampo (Aroniadou y Keller, 1995).
- Depresión a largo plazo; es decir, el proceso contrario al descrito anteriormente, juega un papel esencial en el aprendizaje y la memoria (Braunewell y Manahan-Vaughan, 2001).

Algunas sinapsis se pueden autoregular, a este fenómeno se le ha llamado metaplasticidad (Fischer y cols., 1997) y los cambios de actividad de neuronas aisladas se deben a esta fenómeno (Gandolfo y cols., 2000), del mismo modo que la deficiencia en la función sináptica y las relaciones temporales entre conjuntos de neuronas en rangos de oscilación específicos (Laubach y cols., 2000). Una combinación de estos mecanismos pueden llevar a la modulación de la conducta a través de una reorganización tanto de redes elocuentes como de la elaboración de nuevas redes.

Debido a la conexión dinámica de los mapas funcionales, la estabilización de representaciones corticales se mantiene mediante una red de interneuronas GABAérgicas inhibitorias (Jacobs y Donoghue, 1991). Normalmente estas interneuronas bloquean conexiones horizontales, particularmente entre células piramidales. Sin embargo, si se elimina esta inhibición, estas conexiones intracorticales se vuelven funcionales (Riout-Pedotti y cols., 1998), por lo tanto, este despertar de conexiones latentes (Malenka y Nicoll, 1997) representa un mecanismo importante de la plasticidad a corto plazo (Blitz y cols., 2004). Este proceso se facilita por las redes talamo-corticales (Ridding y cols., 2000) y por mecanismos capaces de cambiar rápidamente el nivel de estimulación de las neuronas y de la transmisión sináptica.

La glia juega un papel importante en la modulación de la actividad neuronal (Horner y Palmer, 2003). Debido a su ubicación anatómica entre la sinápsis y los vasos, los astrocitos representan una interface esencial en la unión neurovascular a través de la regulación del mecanismo de energía (Bonvento y cols., 2002). Al liberar neurotransmisores y otras moléculas de señales extra celulares, la glia puede afectar los estímulos neuronales, la transmisión sináptica y coordinar la actividad a través de las redes de neuronas (Fields y Stevens-Graham, 2002).

También pueden comunicarse con otras células gliales a través de oleadas intracelulares de calcio (Rouach y cols., 2000) y vía difusión intracelular de mensajeros químicos, constituyendo su propia red glial capaz de mantener intercambio de información con circuitos neurosinápticos (Haydon, 2001). La glia tiene un papel fundamental durante el desarrollo de la plasticidad, ya que coordina la migración neuronal de la zona subventricular hacia la corteza (Hatten, 2002) y está involucrada en el control del número de sinápsis (Ullian y cols., 2001). Los astrocitos muestran un alto grado de plasticidad en su fenotipo ya que su morfología cambia durante la migración neuronal, maduración y degeneración, lo que sugiere que los astrocitos deben ajustarse constantemente para afrontar los cambios en el ambiente celular (Shao y McCarthy, 1994). Se han demostrado modificaciones en el tamaño de la glia, en ocasiones en cuestión de horas, tanto en su fisiología (Langle y cols., 2002) como tras una lesión (Trachtenberg y cols., 2002).

La plasticidad dependiente de la experiencia se acompaña por un incremento en los grados de sinápsis, sugiriendo que la experiencia lleva a la formación o eliminación de sinápsis y que estos cambios pueden estar ligados a cambios importantes en los circuitos neuronales (Trachtenberg y cols., 2002). La plasticidad sináptica-morfológica también puede inducirse por daño cerebral (Ivanco y Greenough, 2000), pues los axones pueden presentar regeneración espontánea y alargamientos (Selzer, 2003). Sin embargo, en una lesión las moléculas en el ambiente extracelular o aquellas asociadas con la mielina pueden inhibir dicho crecimiento axonal (GrandPre y cols., 2000).

2.2 NEUROGÉNESIS

La neurogénesis dentro del bulbo olfatorio, el giro dentado (Gould y Gross, 2002) y la neocorteza en adultos primates no humanos resulta en la generación de nuevas neuronas. Este fenómeno también ha sido demostrado en el cerebro adulto del humano (Steindler y Pincus, 2002; Sanai y cols., 2004). Se ha demostrado *in vitro* la neurogénesis de células progenitoras multipotenciales aisladas de la neocorteza

temporal epiléptica (Pincus y cols., 1997), hipocampo (Roy y cols., 2000) y materia subcortical blanca (Nunes y cols., 2003). Estas nuevas neuronas pueden jugar un papel importante en el aprendizaje y la memoria a través de la modulación de circuitos neurosinápticos, la elaboración de nuevas conexiones entre ellas y el desarrollo de nuevas redes (Gross, 2000). También pueden estar involucradas en la plasticidad Post-lesión. Existen reportes de que en ratones adultos pudieron generarse precursores neuronales *in situ*, para diferenciarlos de las neuronas maduras dentro de áreas neocorticales que normalmente no tienen neurogénesis (Magavi y cols., 2000).

La influencia de las neurotrofinas, la expresión genética (Johansson y cols., 1999), el ambiente social (Johansson, 2003), el estrés y el ejercicio (Cotman y Berchtold, 2002) en la plasticidad neuronal y conductual también han sido estudiadas con posibles interacciones entre estos factores.

NIVEL MACROSCÓPICO

3.1 DIASQUISIS

Los cambios funcionales (electrofisiológicos, metabólicos y hemodinámicos) en estructuras remotas del sitio del daño cerebral focal se han asociado como subyacentes a los cambios cerebrales después del daño (Von Monakow, 1914; Feeney y Baron, 1986; Nguyen y Botez, 1998). Su resolución secundaria puede formar parte de la recuperación funcional espontánea (Seitz y cols., 1999).

3.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE MASAS

En lesiones amplias la redistribución dentro del área dañada puede ser insuficiente para recuperar la funcionalidad. Debido a esto intervienen primero áreas perilesionales; después, si aún es insuficiente, estructuras remotas ipsihemisféricas (Weiller, 1998; Rijntjes y Weiller, 2002). Por último, dada la supresión de la inhibición transcallosal,

también pueden intervenir estructuras funcionales homólogas del hemisferio contralateral.

3.3 PLASTICIDAD MODAL CRUZADA

Cuando la lesión involucra muchos epicentros dentro de una red neuronal es posible el reclutamiento de estructuras que inicialmente no pertenecían a este circuito, este fenómeno es llamado plasticidad cruzada (Kujala y cols., 2000; Shimojo y Shams, 2001; Hubel y Wiesel, 1965; Bavelier y Neville, 2002). Por ejemplo, los pacientes con pérdida visual congénita desarrollan mejores habilidades auditivas que las personas con visión normal, debido al reclutamiento adicional de áreas ubicadas en la corteza visual, mientras que los pacientes con sordera congénita muestran un reclutamiento de áreas de la corteza auditiva durante la estimulación visual

PLASTICIDAD NATURAL EN HUMANOS

Estudios recientes en pacientes sanos han demostrado la existencia de representaciones múltiples de movimientos dentro de la corteza sensoriomotora primaria (Sanes y cols., 1995) con un traslape y organización jerárquica de las diferentes redundancias funcionales (Hlustik y cols., 2001).

Esto concuerda con los estudios de neuroimagen funcional realizados durante el aprendizaje de habilidades nuevas (Bischoff-Grethe y cols., 2004; Jenkins y cols., 1994; Pascual-Leone y cols., 1994). Se observó la extensión del área de activación, que indica el reclutamiento de sitios adyacentes para facilitar la adquisición de nuevas secuencias motrices. Este fenómeno puede ser transitorio o durable (Karni y cols., 1998), particularmente en músicos (Krings y cols., 2000; Munte y cols., 2002). Estas observaciones apoyan el hecho de que el área sensoriomotriz primaria va más allá del control de movimientos, es decir que está involucrada en funciones cognitivas: aprendizaje de habilidades motrices (Hlustik y cols., 2000), imágenes mentales (Ganis y cols., 2000) y cálculo (Pesenti y cols., 2000).

La organización temporal de este mosaico es esencial. Numerosos estudios electrofisiológicos muestran cambios tanto en la actividad de neuronas aisladas como

en la corteza sensoriomotriz tras el aprendizaje de nuevas habilidades (Gandolfo y cols., 2000; Wise y cols., 1998; Hari y cols., 1997; Salenius y Hari, 2003). Estas oscilaciones pueden reflejar la actividad cortical sincronizada de muchas neuronas y permiten la modificación rápida de un conjunto de neuronas involucradas en la ejecución de un movimiento a través de la modulación de las relaciones entre su actuar conjunto (Laubach y cols., 2000; Salenius y Hari, 2003).

La plasticidad también implica cambios en la actividad de las estructuras no primarias de la red sensoriomotriz tales como el área motriz suplementaria y la corteza lateral premotora (Picard y Strick, 2001), cingulum (Paus, 2001), la insula, la corteza parietal posterior (Prablanc y cols., 2003), el cerebelo (Molinari y cols., 1997), el núcleo profundo gris y el tálamo (Desmurget y cols., 2003).

De igual manera, implica cambios en la conectividad efectiva dentro de toda la red funcional (Buchel y cols., 1999), tal y como se ha demostrado al medir la coherencia de la actividad entre las distintas áreas involucradas en las funciones sensoriomotrices (Andres y Gerloff, 1999).

PERSPECTIVAS TERAPEUTICAS BASADAS EN LA PLASTICIDAD CEREBRAL

Actualmente la rehabilitación es considerada como un reentrenamiento basado en la repetición de tareas para facilitar el fenómeno de la plasticidad llevando el reforzamiento positivo de una tarea mientras se inhiben otras (Robertson y Murre, 1999). Se han observado mejoras en pacientes tratados en terapia tanto motriz como de lenguaje.

Al estudiar los efectos de ciertos fármacos que influyen en los mecanismos de potenciación a largo plazo en pacientes con daño cerebral, se ha encontrado que la plasticidad cortical puede modularse por medio de estos fármacos (Schwenkreis y cols., 1999; Butefisch y cols., 2000). La combinación de rehabilitación y fármacos ha sido sugerida para mejorar la recuperación (Bragoni y cols., 2000; Walker-Batson y cols., 1995) pero son muy pocos los pacientes quienes se han beneficiado de estos medicamentos, por lo cual deben evaluarse mejor estas indicaciones.

La estimulación magnética transcraneal es otra forma de modular las representaciones corticales funcionales (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003). Puede facilitar el aprendizaje y potenciar los efectos de la rehabilitación motora (Rossi y Rossini , 2004), la identificación de imágenes (Mottaghy y cols., 1999), el aprendizaje y la memoria (Grafman y Wassermann, 1999), el razonamiento analógico (Boroojerdi y cols., 2001) y la toma de decisiones (Evers y cols., 2001).

La cirugía induce mecanismos compensatorios que reclutan redes latentes, y esta reorganización funcional podría tomarse en cuenta en el tratamiento subsecuente (Duffau y cols., 2002).

Es importante continuar la investigación acerca de los mecanismos de plasticidad involucrados que permitan el desarrollo de estrategias de rehabilitación y farmacológicas en pacientes con daño cerebral, o bien para mejorar el impacto de la terapia física, ocupacional o logopédica.

CAPÍTULO II. RECUPERACIÓN FUNCIONAL DESPUÉS DEL DAÑO CORTICAL.

1.1 PRIMERAS DEMOSTRACIONES ACERCA DE LA PLASTICIDAD CEREBRAL DESPUÉS DEL DAÑO.

Los primeros estudios en encontrar evidencia de que las regiones adyacentes de la corteza se reorganizan en su funcionalidad después del daño cerebral fueron realizados por Gless y Cole (1950), en sus experimentos con macacos a los que se dañó focalmente la corteza motora primaria, particularmente la representación del movimiento de los pulgares. Los resultados mostraron que la representación dañada reapareció en el territorio cortical adyacente. Estudios similares fueron realizados por Jenkins y colaboradores (1987) con resultados muy parecidos. En la década de 1990 Nudo y colaboradores (1996a, 1996b) descubrieron que tras lesiones pequeñas hechas en una porción de la corteza motora en monos ardilla, estos se recuperaban espontáneamente sin recibir estimulación. Estos resultados, en adición a otros han llevado a la conclusión de que la experiencia conductual es un potente modulador de plasticidad cortical después del daño.

1.2 NUEVOS PUNTOS DE VISTA EN CUANTO A LOS MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES SUBYACENTES A LA REORGANIZACIÓN SOMATOTÓPICA.

Se sabe que el daño cortical tiene como consecuencia cambios específicos neurofisiológicos y neuroanatómicos, tanto en los tejidos adyacentes como remotos. Alteraciones estructurales ocurren en la corteza de mamíferos adultos como consecuencia de la experiencia (Diamond y cols., 1972). Entre tres y catorce días después del daño cortical, se ha demostrado en ratas un incremento en la inmunoreactividad de la proteína GAP- 43, lo que sugiere una consecuencia neuronal en la región periférica a la lesión (Stroemer y cols., 1995; Ng y cols., 1988). Entre 14 y 60 días después del daño cortical se eleva significativamente la sinaptogénesis (Stroemer y cols., 1995).

Datos recientes en roedores han demostrado que las neuronas alrededor de la lesión (aquellas en el tejido cortical adyacente al daño) responden con la expresión de un

conjunto específico y altamente coordinado de genes (Carmichael, 2006). Carmichael y colaboradores (2005) encontraron que tras el daño se inducen muchos conjuntos de expresiones de genes del crecimiento a lo largo del periodo de brotes axonales. Existe un incremento en las proteínas que promueven el crecimiento y un decremento de aquellas que lo inhiben en la región adyacente al daño. Tales programas de crecimiento se activan poco después de generado el daño y pueden ser los responsables de los procesos de autoreparación del cerebro. Algunos estudios sugieren que tales programas se activan aún en cerebros seniles demostrando un perfil temporal único (Li y Carmichael, 2006).

Se ha mostrado que en humanos después de infarto cerebral, la corteza periférica al daño tiene un papel importante en la recuperación neurológica (Jaillard y cols., 2005; Teasell y cols., 2005; Cramer y cols., 2006). En pacientes con daño cerebral mayor y con resultados pobres en recuperación conductual parece haber un cambio en la actividad del hemisferio no dañado (Cramer y Crafton, 2006). Después de algunas semanas de rehabilitación, las representaciones motrices en el hemisferio dañado se agrandan en relación al mapa inicial post-daño (Carey y cols., 2002; Traversa y cols., 1997). También en la terapia de movimiento inducido se ha producido un crecimiento significativo de la representación del miembro paralizado en el hemisferio dañado (Liepert y cols., 1998).

1.3 EVENTOS DE PLASTICIDAD REMOTA INDUCIDA POR EL DAÑO CORTICAL.

Las lesiones en la corteza motora hacen más que inhibir las redes de comunicación a través de las vías cortico-fugales, teniendo el potencial de desconectar a la corteza motriz del sistema somatosensorial.

Incluso cuando la corteza motriz queda intacta después de la oclusión de la arteria cerebral media, los mapas motrices se interrumpen, como ya se demostró en ratas (Gharbawie y cols., 2005). La excitación de áreas remotas a la zona dañada es alterada por períodos significativos de tiempo después de la lesión. El incremento en la actividad de receptores NMDA y el decremento de los receptores GABA_A se ha observado tanto

en el hemisferio ipsilateral como en el contralateral. (Redecker y cols., 2000). La reorganización de los mapas motrices también ocurre en las áreas motrices lejanas pero interconectadas con el territorio dañado (Frost y cols., 2003).

Estudios cuantitativos de campos terminales en fibras intracorticales de la corteza premotora ventral demostraron pocos cambios, excepto en un área cortical. Cada animal que ha sufrido daño en la corteza motora mostró un grupo constante de terminales dentro de la corteza primaria somatosensorial que corresponde a la mano. Por lo tanto representa una nueva conexión intracortical entre la corteza frontal y parietal inducida por la lesión (Nudo, 2006).

Es sabido que tras lesiones corticales en ratas, las fibras cortico-estriatales que principalmente conectan varias áreas motrices con el estrato ipsilateral, brotan de la corteza intacta opuesta a la lesión y terminan en el estrato contralateral (Napieralski y cols., 1996). Bajo ciertas condiciones la corteza intacta puede enviar nuevas proyecciones a porciones denervadas del núcleo rojo y la médula espinal (Chen y cols., 2002).

El daño unilateral en la corteza motora en ratas resulta en cambios bien definidos en zonas análogas de la corteza contralateral, siguiendo una secuencia temporal (Jones y Schallert, 1994). La arborización dendrítica ocurre después de dos semanas aproximadamente, seguida por un incremento de la sinaptogénesis en la capa V un mes después de la lesión. Se cree que estos cambios están asociados a una compensación conductual del miembro menos afectado (Luke y cols., 2004; Bury y Jones, 2004). Sin embargo, pacientes humanos con daño unilateral muestran un control motor alterado en el miembro ipsilateral a la lesión, es decir, el miembro no dañado (Hermsdorfer y cols., 1999; Yarosh y cols., 2004; Quaney y cols., 2005). Entonces, no es claro si las alteraciones ipsilaterales a la lesión son el resultado de alteraciones en las conexiones del cuerpo calloso o bien de vías ubicadas a otro nivel del neuroeje.

1.4 PRINCIPIO DE ACCIÓN DE MASAS

Frost y colaboradores (2003) demostraron recientemente que la representación del miembro anterior ubicada en la corteza premotora ventral, se expande linealmente con respecto al tamaño del daño en la corteza motora. Una interpretación clásica sugeriría que después de lesiones corticales pequeñas el tejido sobreviviente podría ayudar a la recuperación de funciones. Tras lesiones mayores la reorganización del tejido adyacente puede no ser suficiente. Al destruirse más la corteza motora podría no haber suficientes representaciones distales para permitir la recuperación a través de este proceso (Biernaskie y cols., 2005; Shanina y cols., 2006; Hsu y Jones, 2006). Entonces, para poder llevar a una recuperación funcional, regiones cada vez más distales podrían ser reclutadas, aún aquellas zonas análogas intactas que se encuentran en el hemisferio contralateral.

1.5 PLASTICIDAD Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL DESPUÉS DEL DAÑO

La serie de eventos que se dan en las áreas periféricas y remotas a una lesión sugieren que los mecanismos de neuroplasticidad tienen una línea de tiempo clara aunque sus efectos pueden disminuir eventualmente. Estudios recientes en modelos animales han empezado a confirmar que la terapia conductual después del daño focal es más efectiva cuando se lleva a cabo dentro de la primer semana después del daño, para recuperar el desempeño conductual, reorganizar los mapas neurofisiológicos en la periferia del daño y mejorar los cambios neuroanatómicos en el hemisferio contralateral (Biernaskie y cols., 2004; Hsu y Jones, 2005; Barbay y cols., 2006; Kozlowski y cols., 1996; Humm y cols., 1999; Neumann-Haefelin y Witte, 2000).

1.6 DIASQUISIS

La diasquisis cruzada del cerebro se refiere a una hipoperfusión e hipometabolismo cerebelar producida por una lesión cerebral focal grave y remota, la cual se conecta

anat6micamente a trav6s de la materia blanca. Este fen6meno se resuelve com6nmente con el tiempo y est6 generalmente asociado a un infarto cerebral, epilepsia, infecci3n y tumor (Baron y cols., 1980; Patronas y cols., 1984; Thajeb y cols., 1999; Thajeb y cols., 2001; Mewasingh y cols., 2002).

Se cree que el mecanismo subyacente implica una interrupci3n de la ruta cortico-ponto-cerebelosa que causa una deaferentaci3n y una depresi3n metab3lica transneural del hemisferio contralateral del cerebelo (Feeney y Baron, 1986; Meyer y cols., 1993; Gold y Lauritzen, 2002).

CAPÍTULO III. FARMACOLOGÍA DE LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL

1. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS EN ANIMALES.

En estudios realizados en la rata, se ha demostrado que la administración de δ -anfetamina retarda los déficits funcionales producidos por diversos tipos de lesiones focales. Feeney y cols. (1982) encontraron que la recuperación funcional se aceleró después de la administración de una sola dosis de δ -anfetamina, aplicada 24 horas después de la ablación unilateral de la corteza somatosensorial, mientras que otros autores han reportado que esta droga acelera la recuperación de la función sensitiva perdida a consecuencia del infarto cortical (Hurwitz y cols., 1989), mejora la función motora previamente alterada por la oclusión de la arteria cerebral media (Stroemer y cols., 1994) y facilita la recuperación motora después del daño focal traumático en el cerebro (Prasad y cols., 1995). Aunque estos resultados sugieren que el efecto de la δ -anfetamina consiste en acelerar el proceso de recuperación en la rata, en otras especies se ha observado que la administración de esta droga reanuda las funciones que de otra manera permanecerían totalmente perdidas. Un ejemplo lo constituye la observación de que la δ -anfetamina promueve la recuperación motora en gatos con ablación tanto unilateral como bilateral de la corteza frontal (Hovda y Feeney, 1984; Sutton y cols., 1989) y restituye la visión estereoscópica en gatos con lesiones bilaterales de la corteza visual (Feeney y Hovda, 1985; Hovda y cols., 1989). Existen más trabajos que se han enfocado a evaluar el efecto de la δ -anfetamina sobre la recuperación funcional (Goldstein y cols., 1990; Dietrich y cols. 1990).

Se sabe que la administración sistémica de δ -anfetamina produce la elevación de la presión sanguínea, bradicardia, vigilia conductual e hipermotilidad (Innes y Nickerson, 1985), mientras que la dextroanfetamina induce cambios en el flujo sanguíneo regional del cerebro (Mathew y Wilson, 1985). La acción central de las anfetaminas es mediada por la neuronas serotoninérgicas, dopaminérgicas y noradrenérgicas (Fuxe y Ungerstedt, 1970), a pesar de lo cual se cree que la recuperación se debe a los efectos específicos de estas drogas sobre la noradrenalina (NA) cerebral. Esta hipótesis se sustenta en la observación de que el pretratamiento con N-(2-Cloroetil)-H-etil-2-bromobencilamina (DSP-4), una neurotoxina que elimina la NA cerebral, retarda significativamente la

recuperación después del daño en la corteza motora (Boyeson y cols., 1992a). También se ha encontrado que la infusión intraventricular de NA en animales lesionados y la administración de anfetaminas producen el mismo efecto sobre la recuperación funcional (Boyeson y Feeney, 1990). Una observación significativa es que la lesión bilateral del locus ceruleus, el núcleo que se constituye como la principal fuente de NA cerebral, dificulta la recuperación funcional después del daño en la corteza somatosensorial (Boyeson y cols., 1992b; Goldstein, 1997a).

Admitiendo que las anfetaminas actúan a través del sistema noradrenérgico, se esperaría que las drogas que producen tanto la liberación como la disminución del metabolismo de NA tendrían un efecto favorecedor de la recuperación. Tal es el caso de la yohimbina y el idaxozan, dos antagonistas de los receptores adrenérgicos α_2 , que incrementan la liberación de NA y que en una sola dosis favorecen la recuperación motriz después del daño unilateral en la corteza sensoriomotora de la rata (Goldstein y cols., 1989; Sutton y Feeney, 1992). Se ha reportado que otras drogas semejantes a las anfetaminas, como la fentermina (Hovda y cols., 1983), la fenilpropanolamina (Feeney y Sutton, 1987) y el metilfenidato (Kline y cols., 1994), también aceleran la recuperación motriz después del daño cerebral focal.

Por el contrario, se esperaría que las drogas que disminuyen, incrementan el metabolismo o bloquean los efectos postsinápticos de la NA podrían retardar o anular el proceso de recuperación.

Efectivamente, se ha encontrado que la administración de clonidina, un agonista del receptor adrenérgico α_2 , dificulta la recuperación de manera dosis-dependiente (Goldstein y Davis, 1990a), mientras que los animales ya recuperados presentan nuevamente los déficits neurológicos (Sutton y Feeney, 1992; Stephens y cols., 1986). La administración de dos antagonistas del receptor adrenérgico α_1 , la prazosina (Feeney y Westenberg, 1990; Sutton y Feeney, 1992) y la fenoxibenzamina (Feeney y Westenberg, 1990) mostró que también dificulta el desarrollo de la recuperación funcional. Sin embargo, la administración de propanolol, un antagonista no selectivo del receptor adrenérgico Beta, no mostró ningún efecto (Feeney y Westenberg, 1990).

Por otro lado, el haloperidol, un antagonista tanto de los receptores dopaminérgicos como de los noradrenérgicos (Davis y cols., 1978; Cohen y Lipinski, 1986), bloquea

tanto la recuperación inducida por la administración de anfetaminas en la rata (Feeney y cols., 1982), como la restauración de la visión estereoscópica en gatos con lesiones en la corteza visual (Feeney y Sutton, 1987).

Además del haloperidol, otras butirofenonas como la fluanisona y el droperidol, también restablecen los déficits en ratas que han recuperado la función motriz después del daño cortical (Van Hasselt, 1973).

Puesto que el haloperidol actúa a nivel de los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico, se supondría que la actividad de la dopamina (DA) también estaría involucrada en la recuperación funcional. Sin embargo, se ha reportado que la administración intraventricular de DA no tiene efectos significativos sobre la recuperación de la hemiplejía después del daño en la corteza sensorimotora en la rata (Boyeson y Feeney, 1990), lo que sugiere que el efecto del haloperidol sobre la recuperación está mediado por la acción noradrenérgica de esta droga y no por la acción de los mecanismos dopaminérgicos. Por otro lado, se sabe que los antidepresivos afectan la recaptura y el metabolismo de una variedad de neurotransmisores cerebrales, incluyendo a la NA. La experimentación con estas drogas ha mostrado efectos contrastantes. Se ha reportado que la dosis única de trazodona retrasa la recuperación motora en ratas con daño cortical y reintegra la hemiparesia en ratas ya recuperadas (Boyeson y Harmon, 1993), mientras que una sola dosis de desimipramina facilita la recuperación motora (Boyeson y Harmon, 1993). Otras drogas tales como la fluoxentina y la amitriptilina no han mostrado efectos sobre la recuperación después del daño cerebral focal (Boyeson y cols., 1994). Esta variedad de efectos podría deberse a la capacidad que posee cada uno de los fármacos empleados para modificar uno o más sistemas de neurotransmisores.

Aunque hasta ahora nos hemos centrado en los efectos mediados por la NA, no se descarta la participación de otros neurotransmisores en el proceso de recuperación funcional después del daño cerebral. Por ejemplo, se sabe que la infusión intracortical de ácido gama-amino-butírico (GABA) retarda la recuperación de las secuelas producidas por una pequeña lesión cortical en la rata (Brailowsky y cols., 1986a), mientras que la administración aguda de diazepam, una benzodiacepina que actúa como un agonista indirecto del GABA, impide de manera permanente la recuperación

de la asimetría sensorial debida al daño de la neocorteza anteromedial en la rata (Schallert y cols., 1986). Se ha encontrado, sin embargo, que los ansiolíticos que no actúan a través del complejo de los receptores GABA/benzodiazepinas, como la gepirona, no afectan en ningún grado a la recuperación funcional en modelos animales de daño cerebral similares a los anteriormente descritos (Schallert y cols., 1992).

Las consecuencias del uso de anticonvulsivos también se han descrito. Por ejemplo, el efecto nocivo del GABA sobre la recuperación funcional después del daño en la corteza motora se incrementa por la administración sistémica de fenitoína (Brailowsky y cols., 1986b), la cual actúa a través de un mecanismo mediado por GABA. El fenobarbital también retarda la recuperación después del daño en la corteza cerebral (Hernández y Holling, 1994), mientras que la administración crónica de carbamazepina no la afecta (Schallert y cols., 1992).

1.1 POSIBLES MECANISMOS DE RECUPERACIÓN FUNCIONAL MODULADA POR LOS NEUROTRANSMISORES.

Desde las observaciones originales de Feeney y cols. (1982), se ha comprobado que la función motora de ratas hemipléjicas mejora significativamente después de recibir una dosis de amfetamina, mejoría que es detectada una hora después de la administración de la droga. Esto sugiere que la amfetamina tiene un efecto fisiológico inmediato que subyace a este beneficio inicial. Feeney ha postulado que las amfetaminas podrían facilitar la recuperación suprimiendo a la "depresión funcional remota" de regiones cerebrales distantes del sitio de daño primario. Esta suposición se encuadra en el concepto de diasquisis (Glassman y Smith, 1988), término que describe los efectos transitorios de una lesión que aparece en regiones distales del sitio primario del daño (Brailowsky y Piña, 1991) y se sustenta en los hallazgos provenientes de estudios en una variedad de modelos de daño cerebral (Theodore y cols., 1992; Feeney, 1991). Un ejemplo de depresión funcional remota lo constituye el hecho de que pacientes con daño cerebral presentan disminución del metabolismo en el área hemisférica ipsilateral no dañada y en el hemisferio contralateral, así como en el cerebelo contralateral (Fiorelli y cols., 1991; Tanaka y cols., 1992). Se ha discutido que la mejoría debida a las

microinfusiones de NA en el hemisferio cerebelar contralateral al daño cortical (Boyeson y Krobert, 1992; Figura 1) podría ser explicada considerando las interconexiones que existen entre las células noradrenérgicas del locus coeruleus (LC) y otras zonas encefálicas (Figura 2). Se sabe que cada célula del LC proyecta tanto a la corteza sensoriomotora como al cerebelo contralateral (Nagai y cols., 1981), así que cuando hay una lesión cortical las fibras provenientes del LC también se dañan, haciendo que las células noradrenérgicas cambien su producción de NA a la de síntesis de proteínas de reparación (Ross y cols, 1975). Por lo tanto, un aporte externo de NA en el cerebelo mejora la actividad motora de animales con lesión cortical. Esto apoya la idea de que la hemiplejía parece ser mediada por la acción depresora sobre las terminales aferentes del LC al cerebelo. Cuando los animales reciben una lesión del área dorsal del LC, la cual suministra de NA a la corteza, las terminales que van al cerebelo quedan intactas. Si en dos semanas se lesiona la corteza sensoriomotora del animal, éste está protegido de los efectos de la hemiplejía (Boyeson y cols, 1992b).

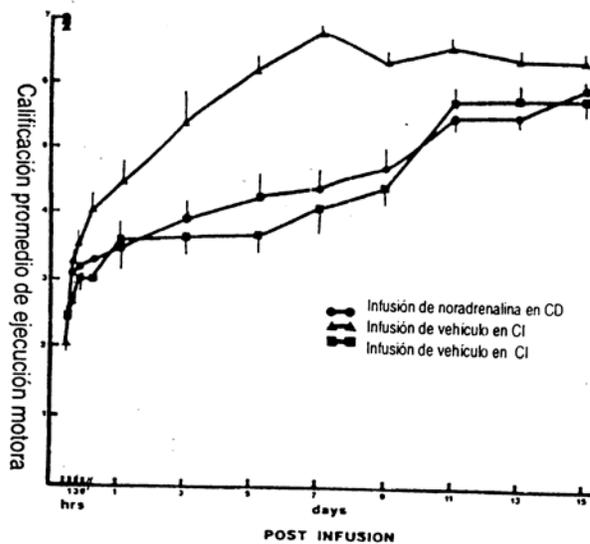
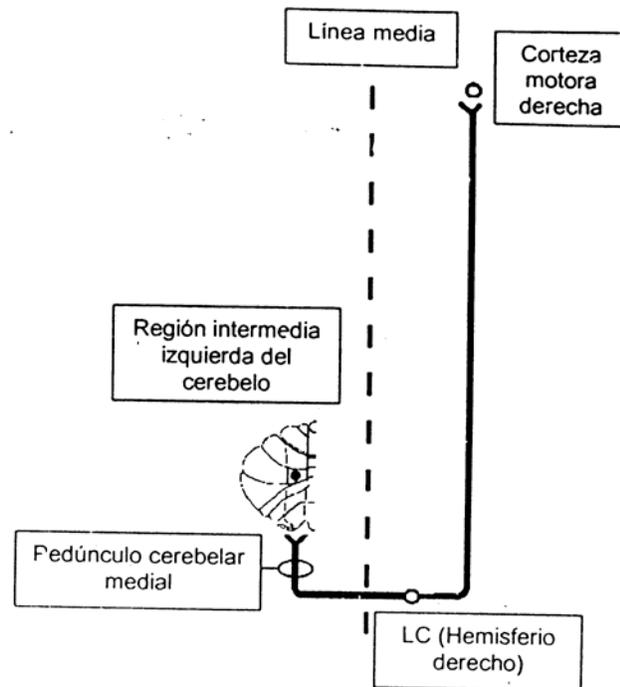


Figura 1. Efecto de la infusión de noradrenalina en el hemisferio cerebelar derecho (CD) e izquierdo (CI) 24 horas después de la ablación de la corteza motora situada en el hemisferio derecho. Se observa que los animales con infusión en CD presentan mayores calificaciones en la evaluación motora mediante la barra de equilibrio, mientras que los animales con infusión en

CI presentan un retardo en la recuperación (Tomado de Boyesson y Krobert, 1992).

Figura 2. Esquema que muestra las vías aferentes del locus coeruleus (LC) que llegan a la corteza motora y al cerebelo. Cada una de las células del hemisferio derecho del LC envía sus aferencias a la región motora cortical situada en el hemisferio cerebral derecho y al hemisferio izquierdo del cerebelo.



Lógicamente, desde el punto de vista terapéutico, las drogas que prolongan o empeoran esta depresión funcional deberán ser consideradas como dañinas, mientras que aquellas que la promueven deberán ser consideradas como facilitadoras de la recuperación.

Sin embargo, la diasquisis seguida a la supresión funcional no siempre se presenta como consecuencia del déficit clínico después del daño cerebral en el humano (Bowler y cols., 1995) e incluso, la aparición de la diasquisis cerebelar cruzada (DCC) no se correlaciona con la recuperación después del daño que afecta a uno de los hemisferios cerebrales (Infeld y cols., 1995). Es más, las manifestaciones clínicas primarias de la DCC se manifiestan en una flacidez prolongada asociada a la hemiparesia relacionada con el daño cerebral (Pantano y cols., 1993). Esas importantes observaciones clínicas representan un desafío que la teoría de la diasquisis tiene que enfrentar para explicar los procesos de recuperación funcional.

Una segunda hipótesis está basada en la observación de que el impacto de ciertas drogas, como las anfetaminas, es dependiente del grado de experiencia que los animales poseen al momento de la administración (Hovda y cols., 1989; Goldstein y

Davis, 1990b), lo que sugiere que podrían actuar facilitando un proceso de "reaprendizaje". En este sentido, la potenciación a largo plazo (PLP) es el mecanismo celular de aprendizaje y memoria mejor entendido (Bliss y Dolphin, 1982). La PLP se ha estudiado en diversas regiones cerebrales, incluyendo aquellas que no han sido asociadas con la memoria, tales como el hipotálamo (Corbett, 1980), la corteza visual (Artola y Singer, 1989; Aroniadou y Teyler, 1991) y la corteza motora (Keller y cols., 1990). Se sabe que su inducción puede ser modulada tanto por las catecolaminas (Stanton y Sarvey, 1985; Dahl y Sarvey, 1989) como por el GABA (Wigstrom y Gustafsson, 1985; Olpe y Karlsson, 1990). De acuerdo a la hipótesis del "reaprendizaje", los efectos de las drogas sobre la recuperación podrían predecirse basándose en sus efectos sobre la inducción de la PLP (Goldstein, 1996). Sin embargo, no siempre estas predicciones son exactas, ya que el propanolol, un antagonista de los receptores β -adrenérgicos que interfiere con la inducción de la PLP (Dahl y Sarvey, 1990), no tiene efectos sobre la recuperación motora después del daño en la corteza sensoriomotora de la rata (Feeney y Westerberg, 1990).

Es posible que las respuestas fisiológicas adaptativas que subyacen al efecto inmediato de las anfetaminas y otras drogas similares, dirijan a una reorganización neuronal de largo plazo. En este sentido, se ha propuesto a la NA como una sustancia implicada en los cambios tróficos del sistema nervioso central (Kasamatsu y cols., 1979), además de que la NA cortical liberada por las aferencias del locus ceruleus modula a la plasticidad sináptica que codifica el aprendizaje (Crow, 1968). En un modelo de plasticidad en el gato (Kasamatsu y cols., 1979), se evaluaron los cambios plásticos en la corteza visual a consecuencia de la privación monocular de luz, encontrándose que la perfusión de β -hidroxidopamina bloqueaba ésta plasticidad, mientras que la infusión de NA posterior al bloqueo la restituyó. Con el fin de determinar los mecanismos que subyacen a la recuperación motora inducida por anfetaminas y NA, primero es necesario localizar las regiones del sistema nervioso donde el efecto se ejerce. Con base en los estudios que previamente se han discutido, podría suponerse que la privación de NA en áreas críticas del cerebro debería de frenar o agravar la mejoría conductual en animales en proceso de recuperación del daño cerebral. Esto ha sido realizado a través de lesiones selectivas del locus ceruleus y sus vías eferentes. Se ha encontrado que la lesión

selectiva del paquete noradrenérgico dorsal que proyecta al hemisferio contralateral a la lesión retarda la recuperación de ratas lesionadas en la corteza somatosensorial, no así cuando se lesionan las fibras que proyectan al hemisferio ipsilateral (Goldstein y Bullman, 1997). Esto sugiere que el efecto de la NA está mediado por el hemisferio cerebral contralateral a la lesión cortical. Esta suposición se puede apoyar también en los resultados de los estudios de Stroemer y cols. (1995, 1998) quienes reportaron el incremento de la inmunoreactividad a la sinaptofisina en la corteza parietal contralateral a la lesión y esto se correlacionó con la recuperación motora en ratas tratadas con amfetamina. Por otro lado, se ha reportado el aumento de la densidad dendrítica en las células piramidales de la capa V, en la región homotípica contralateral a la lesión realizada en la corteza sensoriomotora de ratas (Jones y Schallert, 1994; Schallert y Jones, 1993). Un estudio por tomografía de emisión de positrones realizado en humanos recuperados después de la hemiplejía debida a enfermedad cerebrovascular (choque), mostró incremento del flujo sanguíneo cerebral en la corteza motora contralateral al daño (Chollet y cols., 1991). Por otro lado, el uso de resonancia magnética ha mostrado algunos cambios similares en el hemisferio contralateral de pacientes que han recuperado la función motora después del daño por choque (Cao y cols., 1998; Silvestrini y cols., 1998). También los estudios que emplean estimulación magnética transcraneal han demostrado cambios significativos en el hemisferio contralateral, incluyendo el desenmascaramiento de algunas proyecciones corticoespinales ipsilaterales (Netz y cols., 1997). Sin embargo, este desenmascaramiento no se correlaciona con la mejoría clínica de las secuelas.

Todo lo anterior podría sugerir que las amfetaminas ejercen su impacto en la recuperación a través de algunos procesos modulados por la NA en el hemisferio contralateral al daño cortical. Estos efectos contralaterales dirigirían secundariamente a la producción de la reorganización neuronal en el hemisferio ipsilateral a través de las conexiones transcallosales directas (Meyer y cols., 1998).

2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS DESPUÉS DEL DAÑO CEREBRAL EN EL HOMBRE.

El primer estudio que evaluó el efecto de las anfetaminas sobre la recuperación funcional en humanos fue diseñado para simular el paradigma usado en el laboratorio. Ocho pacientes con déficits motores estables fueron asignados azarosamente a dos grupos, uno de los cuales recibió 10 mg de anfetamina mientras que el otro fue tratado con placebo, todos durante 10 días después del daño cerebral por choque (Crisostomo y cols., 1988). Después de tres horas de la administración de la droga, a todos los pacientes se les proporcionó terapia física intensiva. Al día siguiente, se reevaluaron las habilidades de cada paciente para usar el miembro afectado. Los resultados mostraron que el grupo que fue tratado con anfetamina mejoró en las tareas de ejecución motora, mientras que el que fue tratado con placebo mostró muy poca recuperación. Desde el punto de vista clínico, se debe de considerar que en este estudio se tomó en cuenta sólo un pequeño grupo de pacientes rigurosamente seleccionados, que dos de los cuatro que recibieron anfetamina tuvieron una mejoría importante y que solamente fue evaluada la recuperación motora lograda en un corto período de tiempo.

En un segundo estudio (Reding y cols., 1995), doce pacientes recibieron 10 mg de anfetamina diariamente durante 14 días, al término de los cuales se siguió con una dosis de 5 mg durante 3 días. Por otro lado, un igual número de pacientes recibió placebo. El estudio se inició aproximadamente un mes después de producido el daño cerebral y la administración de la droga o placebo no fue complementada con terapia física. Los resultados fueron negativos, pero sugieren la existencia de algunas variables que todavía no han sido bien identificadas que subyacen a la recuperación funcional en humanos. Debe de considerarse que en este estudio se utilizó un régimen de dosificación diferencial, que hubo un retardo entre la producción del daño y la administración del tratamiento y se careció de complementación con terapia física.

Walker-Batson y cols. (1995), realizaron un estudio de doble ciego que consistió en administrar anfetamina a cinco pacientes y placebo a otros cinco. El tratamiento se administró cada 4 días durante 10 sesiones y comenzó entre los 15 y 30 días después del daño cerebral. Cada dosis fue administrada en conjunto con una sesión de terapia física intensiva. Una semana después de finalizado el tratamiento, los resultados

mostraron que los pacientes tratados con anfetamina presentaron una mejoría importante de la ejecución motora, la cual se mantuvo hasta un año después. En cuanto a otras drogas, se han estudiado los efectos del metilfenidato. Este fármaco se ha empleado en el tratamiento de la depresión presente en los pacientes que han sufrido de daño cerebral y que se encuentran en fase de rehabilitación (Johnson y cols., 1992; Lazarus y cols., 1994). En uno de los dos estudios disponibles en la actualidad no se reporta ningún efecto de la droga sobre la acción física, aún cuando se encontraron efectos significativos sobre la función cardiovascular (Larsson y cols., 1988). En el otro estudio se reportó una mejoría motora muy similar entre pacientes tratados con metilfenidato y aquellos tratados con placebo (Grade y cols., 1998). Aunque en ambos estudios se reportaron resultados negativos, los estudios experimentales sugieren una relación compleja entre la dosis de metilfenidato y la cantidad de entrenamiento rehabilitatorio. Nuevamente es necesario señalar la importancia de identificar las variables que subyacen a la recuperación funcional en el humano, con el fin de determinar si un régimen farmacológico específico puede resultar en un beneficio clínico. Se debe de considerar que aún la recuperación observada en animales hemipléjicos tiene una importante dependencia con el medio ambiente en el que el organismo se relaciona (Custodio-Ramírez y González-Piña, 1992; Escalante-Membrillo y Márquez-Rangel, 1992).

También se ha evaluado el efecto de otros antidepresivos en pacientes con daño cerebral. La tradozona, una droga que bloquea la recuperación de la hemiplejía en la rata, reduce esta incapacidad en pacientes con daño cerebral (Reding y cols., 1986). En otros estudios se ha reportado un efecto benéfico de la flouxetina (Dam y cols., 1996), mientras que la administración de maprotilina y de nortriptilina, dos inhibidores de la recaptura de NA, no han mostrado efectos significativos (Dam y cols., 1996, Lipsey y cols., 1984). Por lo tanto, a diferencia de las anfetaminas, los efectos de los antidepresivos sobre la recuperación funcional parecen ser opuestos a los efectos observados en los estudios de laboratorio. Estos resultados dispares podrían deberse a que tales drogas fueron administradas en una sola dosis en condiciones de laboratorio. La administración aguda de antidepresivos tiene efectos muy diferentes sobre los neurotransmisores cerebrales a los que tiene cuando la administración es crónica. Por

ejemplo, se sabe que la concentración de NA en el cerebro de la rata se reduce después de la administración crónica de desimipramina, mientras que no sucede así después de la administración aguda de este fármaco (Roffler-Tarlov y cols., 1973).

Algunos estudios no controlados han sugerido que la administración de bromocriptina, un agonista de dopamina, mejora la fluidez del habla en pacientes afásicos (Bachman y Morgan, 1988; Sabe y cols., 1992). Sin embargo, dos estudios controlados mostraron resultados negativos (Gupta y cols., 1995; Sabe y cols., 1995). Estos datos contradictorios podrían deberse a una variedad de factores. Los estudios controlados incluyeron pacientes con mucho tiempo de haber presentado el evento cerebrovascular que les provocó el daño cerebral, mientras que uno de los diseños incluyó algunos pacientes con daño cerebral producido por traumatismo craneoencefálico. En los dos trabajos se trató a los pacientes con la máxima dosis tolerable y no dejan en claro si la administración de la droga está acoplada estrechamente a la terapia de lenguaje activa. Es posible entonces, en analogía a los datos que consideran la función motora, que las afasias motoras respondan mejor a una droga que afecte a la NA, en lugar de una que afecte a la dopamina. Esto se puede apoyar en los resultados obtenidos por Walker-Batson y cols. (1992), quienes encontraron una mejoría importante en pacientes afásicos sometidos a un régimen consistente en la administración de una dosis de 10 mg de δ -anfetamina seguida de terapia de lenguaje, todo esto cada cuatro días durante diez sesiones.

Respecto al uso de fármacos perjudiciales para la recuperación, un examen retrospectivo mostró que tanto la clonidina y el prazosin, dos antagonistas noradrenérgicos, así como las benzodiazepinas fueron comúnmente prescritas a pacientes hospitalizados con daño cerebral agudo (Goldstein y Davis, 1988). Esto muestra que algunas de las drogas que han mostrado efectos adversos sobre la recuperación funcional en animales de laboratorio, han sido comúnmente prescritas para el tratamiento de las manifestaciones clínicas presentes en pacientes con daño cerebral. En este sentido, un estudio retrospectivo de cohortes permitió evaluar la recuperación funcional en pacientes que habían recibido ya sea uno sólo o una combinación de medicamentos como la clonidina y la prazosina, las benzodiazepinas y la fenitoína. La recuperación de estos pacientes se comparó con la de pacientes a

quienes no se les administró ninguno de éstos fármacos. Los resultados mostraron que aquellos que recibieron las drogas presentaron tasas de recuperación menores a las de los pacientes que no recibieron el tratamiento (Goldstein y cols., 1990). Un análisis multivariado indicó que el efecto se mantiene aún después de corregirse la contribución de otras variables, tal como la severidad inicial del déficit. Los potenciales efectos perjudiciales sobre la recuperación funcional del uso de estas drogas fueron también descritos mediante el análisis de una cohorte separada de pacientes (Goldstein, 1995). Cerca del 40 % de los pacientes integrados a este estudio recibieron una combinación de drogas que se cree dificultan la recuperación, encontrándose que el grupo tratado con las drogas presentó un efecto deletéreo, independientemente del grado de las secuelas motoras iniciales, de las condiciones de morbilidad y de otras características de los pacientes. Ya que estos estudios implican un análisis retrospectivo (tabla1), no es posible saber si el conocimiento, por parte del paciente, de la razón por la cual la droga fue prescrita, o la acción de la droga por sí misma, es la causa del efecto adverso sobre la recuperación. Otras limitaciones de estos estudios son que no permitieron un análisis del impacto de drogas perjudiciales específicas, ni dejaron conocer los efectos de la administración crónica de diferentes.

La tabla número 1 resume brevemente los resultados más relevantes de algunos de los estudios descritos en la presente revisión.

Los datos revisados sugieren un efecto consistente de las drogas que afectan la recuperación funcional después del daño cerebral focal, tanto en animales de laboratorio como en humanos. Aunque es razonable evitar el uso de drogas sospechosas de detener la recuperación, el uso rutinario de la anfetamina deberá de ser documentado con más estudios clínicos. Se debe de considerar que los efectos benéficos de esta droga sólo se han documentado en un estudio realizado en un centro de atención, con un grupo de pacientes altamente seleccionados. En términos generales, los datos disponibles no muestran un efecto clínico benéfico de una amplia variedad de drogas, por lo que en el futuro se requerirá de estudios más amplios y realizados en múltiples centros de atención, para determinar si el abordaje farmacológico dirigido a facilitar la recuperación funcional después del daño cerebral es factible de ser aplicado en una población más diversa de pacientes con secuelas

motoras. Es también importante identificar las variables psicológicas relacionadas con la recuperación funcional que subyace al daño cerebral en el humano, ya que el control de estas podrá permitir el éxito en el uso de las estrategias farmacológicas.

CAPÍTULO IV. RELACIONES ANATÓMICAS ENTRE LA CORTEZA CEREBRAL, EL PUENTE Y EL CEREBELO.

1. LOCUS CERULEUS

El puente o protuberancia se localiza entre el bulbo raquídeo y el mesencéfalo ventral del cerebelo. El puente de la rata concentra cuatro grupos de neuronas noradrenérgicas que son denominados A4, A5, A6 y A7. El grupo A6 o locus ceruleus (LC) es el más importante en la síntesis y liberación de noradrenalina (NA) (Aston-Jones y Cohen, 2005, Smeets y González, 2000). Es un núcleo compacto localizado en el tegmentum pontino adyacente al cuarto ventrículo del tallo cerebral (Berridge y Waterhouse, 2003). Se estima que el LC del humano adulto tiene entre 45 000 y 60 000 neuronas noradrenérgicas, mientras que en la rata, existen aproximadamente 1500 neuronas por núcleo (Berridge y Waterhouse, 2003).

El LC de los mamíferos se subdivide en las porciones dorsal (Locus ceruleus), ventral (Locus subceruleus) y lateral (parabraquibral, núcleo Kolliker- Fuse) (Smeets y González, 2000). Además del cerebelo, el LC inerva ipsilateralmente a varias estructuras del SNC, como los tubérculos olfatorios, la neocorteza, el hipocampo y el tálamo a excepción de los ganglios basales (Berridge y Waterhouse, 2003). Una de las características más notables de las células del LC es el alto grado de divergencia de sus colaterales, lo cual permite que una simple neurona llegue a inervar extensas zonas de la corteza cerebral (Olanow y Tatton, 1999), siendo las capas III y IV las más invadidas por el LC, mientras que la inervación de la capa I es muy dispersa (Berridge y Waterhouse, 2003). De modo que como complejo nuclear, en términos generales, emite numerosas proyecciones de manera difusa a amplias regiones del SNC como: cortezas sensorial y motora, tálamo, hipotálamo, hipocampo, cerebelo, protuberancia, bulbo y médula espinal (Carpenter, 1994).

Las neuronas noradrenérgicas son importantes para el control de funciones tales como determinación del dimorfismo sexual (Pinos y cols., 2004), modulación del dolor (Mokha y cols., 1986, Kishki y cols., 2006; Cucchiaro y cols., 2006), stress (Mitchell y cols., 2005; Viltart y cols., 2006), remodelación de inervaciones sinápticas (Nakai y cols., 2006; Ishida y cols., 2001ab), promoción del estado de alerta (Aston-Jones y cols.,

1994; Jones, 2003; Hobson y cols., 1975), regulación de los estados de sueño-vigilia (Hobson y cols., 1975; Majumdar y Mallick, 2003), modulación de la generación de respuestas en la corteza cerebral (Motaghi y cols., 2006), procesos de memoria y aprendizaje (Foote y cols., 1983; Gibbs y Summers, 2000; Ishida y cols., 2001; Gibbs y Summers, 2005), control de funciones autonómicas (Jones, 2003, Reyes y cols., 2005; Rodovalho y cols., 2006), así como en alteraciones del SNC como Alzheimer (Szot y cols., 2006, Grudzien y cols., 2006), Parkinson (Gesi y cols., 2000; Olanow y Tatton, 1999), ansiedad (Chappell y cols., 1986; Bissette, 2001) desórdenes circadianos, dependencia a las drogas (Tokuyama y cols., 2001) y depresión (Sachar y cols., 1973; Duman, 2002). Se ha sugerido que los estímulos estresantes activan a las neuronas del LC, incrementando el metabolismo y el recambio de la NA en algunas áreas cerebrales, sugiriendo que el circuito del LC es uno de los componentes importantes que se activa dentro del circuito neuronal (Kawahara y cols., 2000). Además, se ha observado que la estimulación eléctrica del LC produce en el mono conductas asociadas a la angustia o sufrimiento (distrés), tales como la picazón, el giro de la cabeza o el cuerpo y los movimientos de la lengua. Otro caso discutido asociado con la descarga del LC es la conducta mostrada en el gato después de ser expuesto a la presencia de un perro (Passerin y cols., 2000). En la rata se ha observado que la infusión directa con idazoxan, un antagonista de los receptores adrenérgicos alfa 2, induce la liberación de la NA en la corteza frontal, mientras que la infusión de algunos bloqueadores de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) la inhiben (Kawahara y cols., 2000).

2. CONEXIÓN CEREBRO- CEREBELAR

El cerebelo se ha involucrado no solamente en el control de la postura, los movimientos voluntarios y ciertos reflejos, sino también en el control de la conducta, las respuestas viscerales y los procesos cognitivos (Johnson y Ebner, 2000; Schambra y cols., 2005). Del mismo modo, está presente en el proceso del aprendizaje motor (Boyden y cols., 2004), coordinación manual (Debaere y cols. 2004) y coordinación ojo- mano (Miall y Jenkinson 2005).

Asimismo, se ha observado en ratas adultas anestesiadas que la lesión cortical traumática origina cambios en la actividad eléctrica de la corteza cerebelar, es posible que este cambio pueda considerarse como un indicador del daño (Culic y cols., 2005). En humanos con lesiones cerebelares se han observado limitaciones en habilidades como la fluencia verbal (Richter y cols., 2007), memoria de trabajo verbal (Silveri y cols., 1998), errores de detección, planeación y atención (Golla y cols. 2005), habilidades lingüísticas (Ackermann y cols. 2007) y regulación de emociones (Baillieux y cols. 2008).

Diferentes tipos de ataxia, desordenes del neurodesarrollo o vasculares son algunos de los padecimientos cerebelares más comunes (Manto y Marmolino, 2009).

El cerebelo juega un papel central en la ejecución motora de una manera suave y coordinada a través de sus principales conexiones con la corteza cerebral y la médula espinal (Tach et al., 1992; Kawato, 1999). Con respecto a la red que enlaza el cerebelo y la corteza cerebral diversos estudios han mostrado que la salida del cerebelo alcanza el lóbulo frontal, incluyendo la corteza motora primaria y la corteza prefrontal (Middleton y Strick, 1994, 2001; Kelly y Strick, 2003).

Una serie de estudios sugieren que cada área cortical forma un circuito cerrado de bucle con el cerebelo (Hoover y Strick, 1999; Kelly y Strick, 2003; Clower et al., 2005; Akkal et al., 2007).

Mediante el análisis de datos, Strick et al. (2009), han identificado los dominios motor y no motor del cerebelo; el dominio motor está vinculado principalmente con la corteza motora primaria, mientras que el no motor con áreas de asociación corticales como la corteza prefrontal.

3. AFERENCIAS

El cerebelo recibe aferencias a través de los pedúnculos cerebelosos y se distribuyen a lo largo de la corteza por fibras denominadas musgosas y paralelas; estas a su vez hacen sinapsis con las dendritas de las células granulosas y las células de Purkinje sobre la capa molecular (Schambra y cols., 2005). Una parte de las aferencias cerebelares provienen de la corteza cerebelar a través del haz córtico-ponto-cerebeloso, este paquete de fibras pertenece al tracto piramidal conformado por los

axones que se proyectan al cerebelo por una vía indirecta, ya que hacen sinapsis con las neuronas del núcleo pontino y éste último proyecta sus axones a ambos hemisferios cerebrales, predominando los hemisferios contralaterales del cerebelo, específicamente a la corteza cerebelar donde las células granulosas cerebelares de los lóbulos VI y VII parecen ser las responsables de la modulación de las células de Purkinje y estas a su vez de la coordinación de los distintos grupos musculares que ejecutan los movimientos finos y precisos. Además, estos lóbulos reciben aferencias de origen visual, espinal y auditivo. (Bukowska y cols., 2003).

Las fibras musgosas son excitadoras y activan a las células glutamatérgicas de la granulosa que a su vez excitan a las células de Purkinje, a las estrelladas y a las células en cesto. Las tres son caracterizadas por ser GABAérgicas y considerando que existen sinapsis entre estas neuronas se producirá la modulación inhibitoria. Las células de Purkinje inhiben asimismo a los núcleos cerebelosos interpósito y dentado, ya que son las únicas neuronas que comunican a la corteza cerebelar con estos núcleos (Schambra y cols., 2005).

4. FIBRAS NORADRENÉRGICAS

Las aferencias noradrenérgicas que recibe el cerebelo se originan de las porciones dorsal y ventral del LC e inervan a todas las neuronas de la corteza cerebelar y escasamente a los núcleos cerebelosos (Schambra y cols., 2005; Schweighofer y cols., 2004; Figura 3). Se ha sugerido que la liberación de la NA cerebelar está asociada con la activación de los receptores adrenérgicos alfa o beta, donde parece que responden a ciertos niveles o tiempos de exposición durante los estados normales como el de sueño-vigilia o la actividad provocada por los estímulos externos (Schambra y cols., 2005).

Se ha descrito que la lesión cortical reduce en un 50% la concentración extracelular de la NA cerebelar en la rata (Krobert y cols., 1994) y que la lesión del LC reduce también la NA cerebelar. Simultáneamente está asociada con la alteración funcional motora y por ello los efectos de la lesión se revierten por medio de infusiones cerebelares de NA exógena (Schweighofer y cols., 2004). Esto sugiere que la aceleración de la

recuperación motora es debida a los efectos específicos de la NA (Boyeson y Krobert, 1992; Goldstein, 2000).

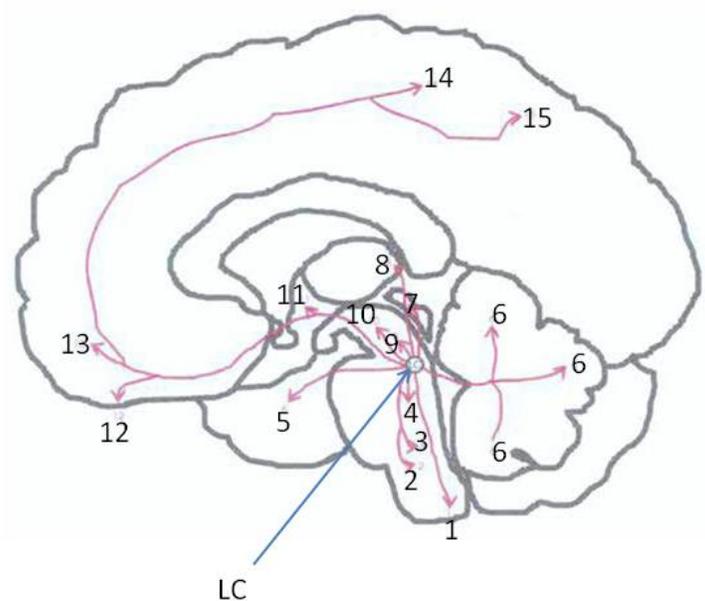


Figura 3. Principales eferencias del núcleo locus coeruleus a diferentes regiones corticales y subcorticales como son: (1) Médula espinal, (2) Núcleo del rafe medial, (3) Núcleo del rafe dorsal, (4) Formación reticular, (5) Hipocampo, (6) Cerebelo, (7) Colículo superior, (8) Núcleo pulvinar, (9) Area tegmental ventral, (10) Sustancia nigra, (11) Núcleo subtalámico, (12) Corteza olfatoria, (13) Corteza prefrontal, (14) Corteza motora primaria, (15) Corteza somatosensorial.

La salida de información del cerebelo, con excepción de la vestibular, es realizada exclusivamente por neuronas del núcleo cerebelar. Un subconjunto de neuronas se proyecta hacia las áreas premotoras teniendo así influencia directa en el control motor, mientras que otras neuronas del núcleo, más pequeñas, se proyectan hacia el olivo inferior, proporcionando una retroalimentación negativa que corrige posibles errores de movimiento (Medina y cols., 2002; Teune y cols., 2000, 1995).

5. ACCIÓN DE LA NORADRENALINA

La liberación de la NA en la corteza cerebelar se ha asociado con la inhibición de las células de Purkinje a través de las células en cesto, de igual modo, se ha relacionado con la modulación GABAérgica a corto y a largo plazo. Asimismo se ha sugerido que los niveles altos de NA activan a los receptores beta adrenérgicos, elevando de este modo el AMP cíclico (AMPC) y activando también el incremento de la proteína kinasa, dependientemente de AMPC. El incremento está asociado con la activación de genes inmediatos tempranos (*c-fos*, *jun-B*) en las células de Purkinje, que pueden ser indicadores del disparo y la transformación de los cambios bioquímicos a largo plazo que son requeridos para el mantenimiento de la plasticidad cerebelar (Schweighofer y cols., 2004).

Las células de Purkinje son las únicas neuronas de la corteza cerebelar que por medio de sus axones hacen sinápsis con los núcleos cerebelosos interpósito y dentado. Estos proyectan sus axones a la corteza cerebral motora primaria por la vía de los núcleos ventrales talámicos. Los núcleos cerebelosos se caracterizan por ser excitadores de las células blanco (Schambra y cols., 2005).

CAPÍTULO V. EFECTOS DE LA LESIÓN CEREBRAL EN LA CORTEZA MOTORA EN EL MODELO DE HEMIPLEJIA EXPERIMENTAL.

Los estudios enfocados a evaluar los efectos tanto de lesiones agudas como crónicas son relativamente escasos en animales experimentales. En este contexto, estos estudios han sido realizados utilizando extirpaciones agudas o bien ablaciones quirúrgicas parciales sucesivas de una estructura cerebral. Se ha demostrado en ratas que los déficits más graves se presentan 36 días después de una ablación aguda de la corteza somatosensorial. Esos déficits están ausentes cuando la misma área se remueve en dos etapas (Finger y cols., 1971). Otro estudio realizado en gatos mostró que los animales caían en un coma profundo y morían después de unos pocos días después de la resección aguda de la formación reticular mesencefálica, en contraste con los animales lesionados gradualmente (pasando hasta por ocho cirugías) que mostraron una recuperación total (Adametz, 1959). El mismo patrón se ha observado en monos, ya que las ablaciones agudas de la corteza prefrontal producen déficits funcionales que son más severos que los observados después de lesiones seriales (Rosen y cols., 1971). Además, los datos obtenidos de pacientes con daño cerebral agudo e invasiones tumorales lentas han permitido discutir que el mismo tipo de disociación se observa en humanos (Desmurget y cols., 2007).

De esta manera, parecería que las secuelas del daño cerebral son menores en las lesiones crónicas que en las lesiones agudas. En este contexto, el mecanismo de recuperación podría diferir entre lesiones producidas por trauma, apoplejía o inducidas por hipoxia. Considerando estos hechos, es importante tomar en cuenta la etiología de la lesión que el paciente sufre con el fin de prescribir el tratamiento adecuado.

Se ha sugerido que el daño cortical induce déficit motores mediados por la inhibición de sitios remotos relacionados con la región dañada (Nudo y cols., 2001). Esta inhibición podría estar mantenida por la severidad del daño, sugiriendo entonces que ciertas lesiones crónicas mantendrían esa inhibición por un período de tiempo mayor que cuando se produce una lesión aguda, en contraste con los datos descritos en párrafos anteriores.

El papel de la noradrenalina (NA) en la recuperación después del daño cerebral se ha documentado ampliamente (Goldstein, 1999; Goldstein, 2003). Se ha reportado que las infusiones de NA dentro del cerebelo (Boyesson y Krobert, 1992) y la administración de anfetamina, un agonista noradrenérgico [9], previene del déficit motor asociado al daño. Este hecho también se ha observado después de la administración sistémica de L-threo-3, 4-dihydroxyphenylserina (L-DOPS), un precursor de NA (Kikuchi y cols., 2000). Algunos estudios realizados mediante microdiálisis han mostrado que la NA extracelular en el cerebelo disminuye después del daño cerebral (Krobert y cols., 1994). Son muy pocos los datos disponibles acerca del papel del puente en los cambios noradrenergicos observados en el cerebelo después del daño. Se sabe que el puente contiene al locus coeruleus (LC), el principal reservorio noradrenergico del sistema nervioso central (Berridge y Waterhouse, 2003) y se han descrito las relaciones anatómicas entre el LC, la corteza motora y el cerebelo (Cicirata y cols., 2005; Steindler, 1981). Ante esto, se ha descrito un incremento de NA en el puente 6 horas después de la ablación cortical (González-Piña y cols., 2005) que podría estar relacionado con las secuelas motoras medidas por el análisis de la huella, lo que podría ser un ejemplo de un daño agudo en animales experimentales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

¿Cómo se modifica la ejecución motora y los niveles de noradrenalina pontinos y cerebelares ante las lesiones corticales agudas y crónicas en el modelo de hemiplejía experimental en la rata adulta?

HIPÓTESIS:

Considerando que existen relaciones anatómicas entre la corteza motora, el puente y el cerebelo y que la actividad noradrenérgica parece estar involucrada en las secuelas del daño y en la recuperación funcional, se espera la modificación de los niveles de noradrenalina a nivel pontino y cerebelar inducidos por la lesión, que se expresaran en la conducta motora. Se espera que habrá variaciones en estos cambios derivados del tipo de lesión que se aplique, ya sea aguda (ablación cortical) o crónica (administración de FeCl_2)

OBJETIVOS:

GENERAL: Describir las características conductuales motoras en el modelo de hemiplejía experimental de la rata inducido por lesión aguda y crónica.

PARTICULARES:

Medir los niveles de noradrenalina cerebelar y pontina en ratas no lesionadas, lesionadas y recuperadas después de la ablación cortical motora y relacionarlos con los efectos sobre la conducta motora.

Estudiar los mecanismos noradrenergicos pontinos y cerebelares específicos involucrados en la recuperación cerebral por medio de la medición del contenido total de NA en ratas con daño cortical inducido por FeCl_2 y en ratas recuperadas del daño.

Comparar las características de las secuelas motoras inducidas por el daño cortical motor mediante ablación de la corteza motora y la administración de FeCl_2 .

Discutir los resultados en función del tratamiento de la discapacidad motora producida por daño cerebral en los seres humanos.

METODO

I. CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUELAS MOTORAS DESPUÉS DE LA ABLACIÓN CORTICAL MOTORA Y CONTENIDO DE NORADRENALINA EN PUENTE Y CEREBELO.

Se utilizaron 29 ratas macho wistar (280-320 g) proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación. Los animales se mantuvieron alimentados con alimento para roedores de laboratorio (Purina) y con un ciclo de luz-obscuridad 12–12 (luz a las 7:00 am). Las ratas fueron adaptadas a las condiciones del laboratorio al menos 1 semana previa a las cirugías. Durante este tiempo, las ratas se manipularon diariamente con el objeto de habituarlas al manejo experimental y posteriormente se les entrenó para caminar dentro de un corredor de madera en cuyo piso se colocó una tira de papel (6.8 X 100 cm, FIGURA 4) con el objeto de obtener la impresión de sus huellas para analizar el largo, ancho y ángulo de la zancada, como se describe en González-Pina y cols. (2006; 2008; Figura 5). Las ratas fueron tratadas de acuerdo a la guía para el cuidado y uso de animales experimentales (Olfert y cols., 1993) y a los criterios de Festing (1994).

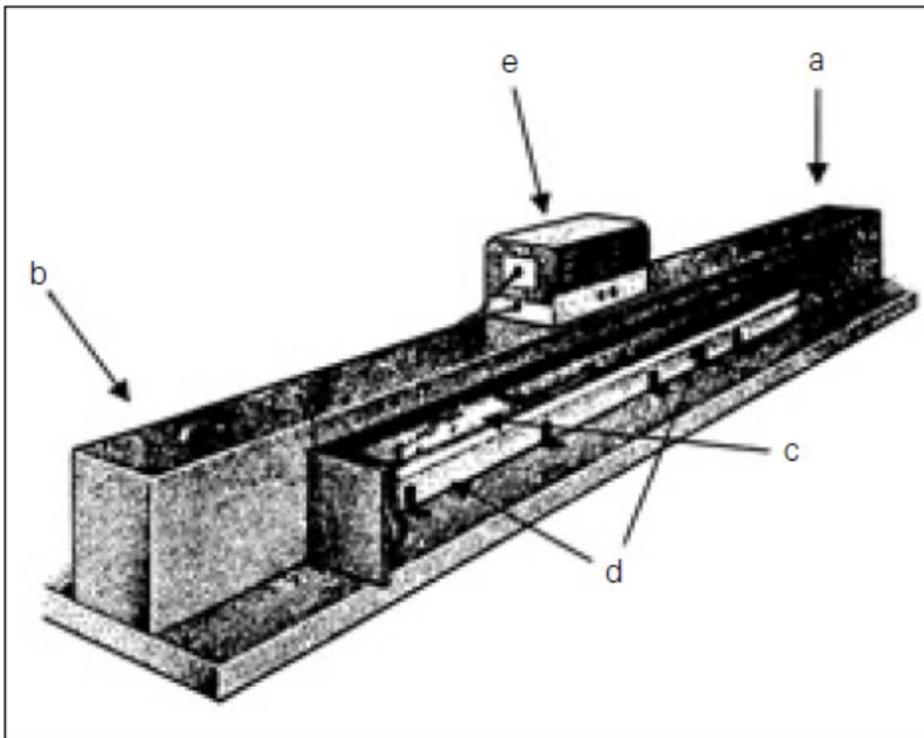


Figura 4. Esquema del corredor empleado en el registro de la impresión de la huella. a) Caja de salida. b) Caja de llegada. c) Rata pasando a través del cuerpo del corredor con las patas entintadas. El suelo de esta parte está cubierto con una tira de papel en la que las huellas quedan impresas. d) Rieles metálicos conectados a un generador de choques eléctricos,

mediante los cuales se administran corrientes eléctricas muy suaves y que se utilizan durante la fase de entrenamiento para castigar las respuestas indeseadas. e) Generador de choques eléctricos.

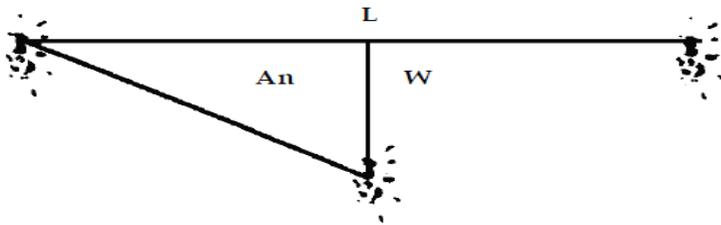


Figura 5. Parámetros de la zancada medidos en una huella típica. L Longitud de la zancada (en cm), W ancho de la zancada (en cm) y An ángulo de la zancada (medido en grados).

Los animales fueron asignados azarosamente a tres grupos: ShamA (SA, n = 11), lesionadas por ablación cortical (AC; n=6) y recuperadas después de la ablación cortical (RAC; n=12). Veinticuatro horas antes de las cirugías, un pre-registro basal de la huella fue tomado en todas las ratas. Luego los animales se anestesiaron con ketamina-xilacina (100 mg/kg - 5 mg/kg) y fueron montados en un aparato estereotáxico (David Kopf). El cráneo se expuso mediante una incisión del cuero cabelludo y se realizó un trépano de 1 mm de diámetro aproximadamente, sobre el sitio cortical representativo del miembro posterior izquierdo (Hall y Lindholm, 1974), situado en las siguientes coordenadas: posterior 2 mm y lateral 2 mm con respecto a bregma. Las ratas de los grupos AC y RAC fueron dañadas en esta área cortical motora (MCx) mediante la aspiración del tejido usando una bomba de vacío (Stoelting, mod. 6C) acoplada a una pipeta de vidrio (1mm de diámetro). Por otro lado todos los procedimientos quirúrgicos con excepción de la aspiración fueron realizados al grupo Sham1. Una vez que los animales se recuperaron de los efectos de la anestesia, la huella fue registrada cada 6 h durante 48 h en los animales de los grupos SA y RAC mientras que en los animales del grupo AC solo se tomó un registro a las 6 horas posteriores a la cirugía. Al final de los períodos de registro, las ratas se sacrificaron por decapitación y tanto los lados derecho e izquierdo del puente como los hemisferios cerebelares fueron extraídos. El cerebro completo fue colocado en una plancha fría para extraer el puente y el cerebelo, que fueron divididos en sus lados derecho e izquierdo. Los tejidos se colectaron en tubos de teflón conteniendo una solución de 0,5 ml de ácido perclórico 0,4 N conteniendo 0,1 % p/v de metabisulfito de sodio. Después los tejidos fueron homogeneizados y centrifugados a 15000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El

sobrenadante fue filtrado y almacenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis cromatográfico. El contenido de NA fue analizado por cromatografía de líquidos alta resolución (HPLC, ALLTECH 626) acoplado a un detector electroquímico coulombiométrico (Coulchem III, ESA, Inc.). Los picos se integraron en una computadora con un programa Agilent EZ Chrom SI. Para determinar las concentraciones de NA, los cromatogramas de las muestras fueron interpolados con los cromatogramas obtenidos de cuatro muestras estándar, cuyas concentraciones de NA eran conocidas. Se utilizó una columna analítica específica para catecolaminas (ALLTECH, adsorbosphere C18 100 X 4.8 mm, 3 μm de tamaño de partícula). La fase móvil utilizada consistió de una solución de buffer de fosfatos (0,1 mM, pH 3.2) cuya composición fue (en mM): octil sulfato de sodio (0.2), EDTA (0.1) y metanol (15 % v/v). El flujo empleado fue de 1.2 ml/min mientras que el potencial fue ajustado a 0.65 V contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

El encéfalo restante fue puesto en una solución de formol amortiguado al 10% para delinear la lesión por medio de la Tinción de Kluver–Barrera. Después de la observación por microscopia de luz, la cavidad fue dibujada sobre los esquemas equivalentes tomados del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson [20].

REGISTROS CONDUCTUALES ADICIONALES

Considerando que el daño cerebral producido mediante ablación cortical representa un modelo de lesión cortical aguda cuyas secuelas son de corta duración, a las ratas del grupo AC se les aplicó una batería de pruebas descrita por Sarti y cols., (2002) y previamente validada por García y cols., (1995), con el objeto de estudiar las secuelas motoras y sensoriales más tempranas. Estos métodos de evaluación fueron usados porque el tiempo para realizar el registro es más corto que el requerido para el análisis de la huella impresa y por lo tanto son más adecuados para medir los efectos sensoriomotores tempranos de la ablación cortical. La batería consta de dos valoraciones motoras para estimar la simetría del movimiento de los cuatro miembros, cuyo procedimiento consistió en tomar de la cola a la rata y levantarla totalmente para observar la simetría en el movimiento de las cuatro extremidades.

Las calificaciones se otorgan de la siguiente manera:

1. Los cuatro miembros se extienden simétricamente.
2. Los miembros de un lado se extienden más o menos lentamente que los del otro lado o se observa una extensión lenta de los cuatro miembros.
3. Los miembros de uno u otro lado muestran una cantidad de movimientos muy limitada.
4. Los miembros posteriores de uno o ambos lados no presentan movimientos.

La otra prueba aplicada fue la de agarre, basada en que normalmente la rata se agarra con las cuatro patas cuando se la coloca sobre la tapa de alambre de su caja y ésta es volteada. Las calificaciones se asignan de este modo:

1. La rata se agarra con las cuatro patas.
2. Uno o los dos lados están alterados mientras el animal se agarra, o bien se agarra de manera defectuosa.
3. La rata tiende a caerse de la jaula.

La calificación final de la evaluación motora fue la suma de las puntuaciones obtenidas en cada una de las pruebas mencionadas.

La evaluación somatosensorial se realizó mediante las siguientes pruebas: para la evaluación de la propiocepción del cuerpo, la rata se tocó con un lápiz en cada costado y se observó la reacción al estímulo. Las calificaciones se asignaron de la siguiente forma:

1. Cuando la rata reacciona volviendo la cabeza hacia el lado donde recibe el estímulo y esta reacción es igual en ambos lados del cuerpo.
2. Cuando la rata reacciona lentamente al estímulo en uno o ambos lados.
3. Cuando la rata no responde al estímulo.

La respuesta al toque de las vibrisas se realizó rozando las vibrisas de cada lado con el lápiz, el cual se aproximó al animal desde la cola hacia delante, para evitar que entrara en su campo visual. Las calificaciones se otorgaron según la siguiente escala:

1. La rata reacciona volviendo la cabeza hacia el lado del estímulo y esta reacción es igual en ambos lados del cuerpo.
2. La rata reacciona lentamente al estímulo independientemente del lado estimulado.
3. La rata no responde al estímulo en uno o en ambos lados.

La calificación final para la evaluación somatosensorial se calculó mediante la suma de calificaciones obtenidas en la propiocepción del cuerpo y en la respuesta al toque de las

vibrisas. Todas estas pruebas fueron realizadas en condiciones basales y se reiniciaron tres horas después de la ablación cortical, durante 3 horas.

La medición de la actividad ambulatoria espontánea se realizó en un monitor de infrarrojos (Stoelting), de la cual no se tomó un registro basal debido a que la prueba exige un tiempo de habituación de al menos tres horas antes del registro, razón por la cual las ratas se introdujeron en el dispositivo inmediatamente después de la cirugía y las mediciones se tomaron tres, cuatro, cinco y seis horas después de la lesión.

Las comparaciones estadísticas entre los valores obtenidos tanto del análisis de la huella (largo, ancho y ángulo de la zancada) como de las medias obtenidas de las pruebas somatosensoriales y motoras se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney ($p=0.05$), mientras que las comparaciones obtenidas del contenido total de NA se realizaron mediante un ANOVA de una sola vía ($p=0.05$).

II. CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUELAS MOTORAS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN DE FeCl_2 EN LA CORTEZA MOTORA Y CONTENIDO DE NORADRENALINA EN PUENTE Y CEREBELO.

Se utilizaron 42 ratas Wistar macho (290-320g) provistas por el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación. Los animales fueron alimentados con Purina para roedores de laboratorio y mantenidas en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 y fueron adaptadas a las condiciones del laboratorio por lo menos una semana antes de las cirugías, tiempo durante el cual fueron manipuladas diariamente con el propósito de habituarlas a las manipulaciones experimentales. Las ratas fueron tratadas de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales [Olfert y cols. 1993].

Los animales fueron anestesiados de acuerdo a los métodos descritos por González-Piña y cols., (2008) y montados a un marco estereotáxico (David Kopf). Una cánula de acero inoxidable elaborada con una aguja sin bisel (no.18) se colocó sobre las meninges sobre la representación cortical motora de los miembros posteriores (Hall y Lindholm, 1974) y fue fijada con acrílico dental. Las heridas fueron suturadas con catgut 00 y cicatrices rociadas con un sanador tópico (furazolidona). Se administró un tratamiento antibiótico durante tres días (tilosina 10mg/kg i.m.). Las ratas se mantuvieron bajo supervisión veterinaria por 8 días posteriores a la cirugía y fueron

aleatoriamente asignadas en tres grupos: shamB (SB; n=16), lesionadas (Fe; n=10) y recuperadas (RFe, n=16). El primer grupo recibió una inyección intraparenquimal de fluido cerebroespinal artificial (CSF 10 ul) en condiciones de movimiento libre y las secuelas motoras fueron evaluadas durante 20 días de registro motor. El grupo Fe recibió 10 ul de CSF conteniendo FeCl_2 y los animales fueron decapitados a los 2 días posteriores a la realización de la lesión. El grupo RFe recibió el mismo tratamiento que el grupo Fe y los déficits motores resultantes de la lesión cortical fueron evaluados durante 20 días. Las lesiones fueron inducidas por la inyección intracortical de FeCl_2 (50mM) que fue disuelta en CSF conteniendo (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1.3 CaCl_2 , 1MgCl₂ y 2.3 NaHCO₃, pH 7.2. La microinyección de hierro en el córtex fue realizada con el fin de simular una lesión cortical reminiscente a una hemorragia subaracnoidea. Al finalizar los periodos respectivos de registro, los animales fueron decapitados para determinar las concentraciones de NA. Los fluidos fueron administrados por medio de la inserción de una aguja a través de la cánula fijada al cráneo, la cual fue insertada a la profundidad de 1mm dentro del parénquima cortical. Esta aguja se encontraba conectada a una jeringa Hamilton (1ml) mediante una manguera (0.6 mm i.d., PEEK tubing BAS), todo colocado en una bomba de microinyección calibrada a un flujo de 1 ul/min.

El análisis motor se realizó por medio del análisis de la huella impresa descrita anteriormente y la prueba de la viga de equilibrio, descrita en Brailowsky y cols. (1986b; FIGURA 6). Esta última permite medir las secuelas tardías del daño cerebral motor. Las mediciones fueron hechas cada 24 horas durante 20 días y posteriormente, las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Los cerebros fueron extraídos y colocados sobre una plancha fría para aislar el puente y el cerebelo, los cuales fueron divididos en sus respectivos lados izquierdo y derecho. Los contenidos de NA fueron determinados por HPLC como ya se describió anteriormente. El encéfalo restante se colocó en una solución de 10% de formol/buffer y se utilizó para localizar y delinear la lesión utilizando la tinción de Kluver-Barrera.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO ADICIONAL: PRODUCTOS LÍPIDICOS FLUORESCENTES.

Considerando que el hierro es un prooxidante, se determinó hacer un análisis de peroxidación lipídica mediante la medición de productos lipídicos fluorescentes en ambos lados del puente y en los dos hemisferios del cerebelo para lo cual se utilizaron la mitad de los animales que conformaron los grupos SB, Fe y Rfe. Se empleó la técnica descrita por Triggs y Willmore (1984) modificada por Santamaría y Ríos (1993). Los resultados del análisis de la huella impresa y las calificaciones obtenidas de la prueba de la viga de equilibrio se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney para grupos correlacionados, mientras que el análisis estadístico de las mediciones de NA y de productos lipídicos fluorescentes se realizaron con un ANOVA simple y un post hoc de Tukey. En todos los casos, los niveles de significancia fueron establecidos en $P \leq 0.05$.

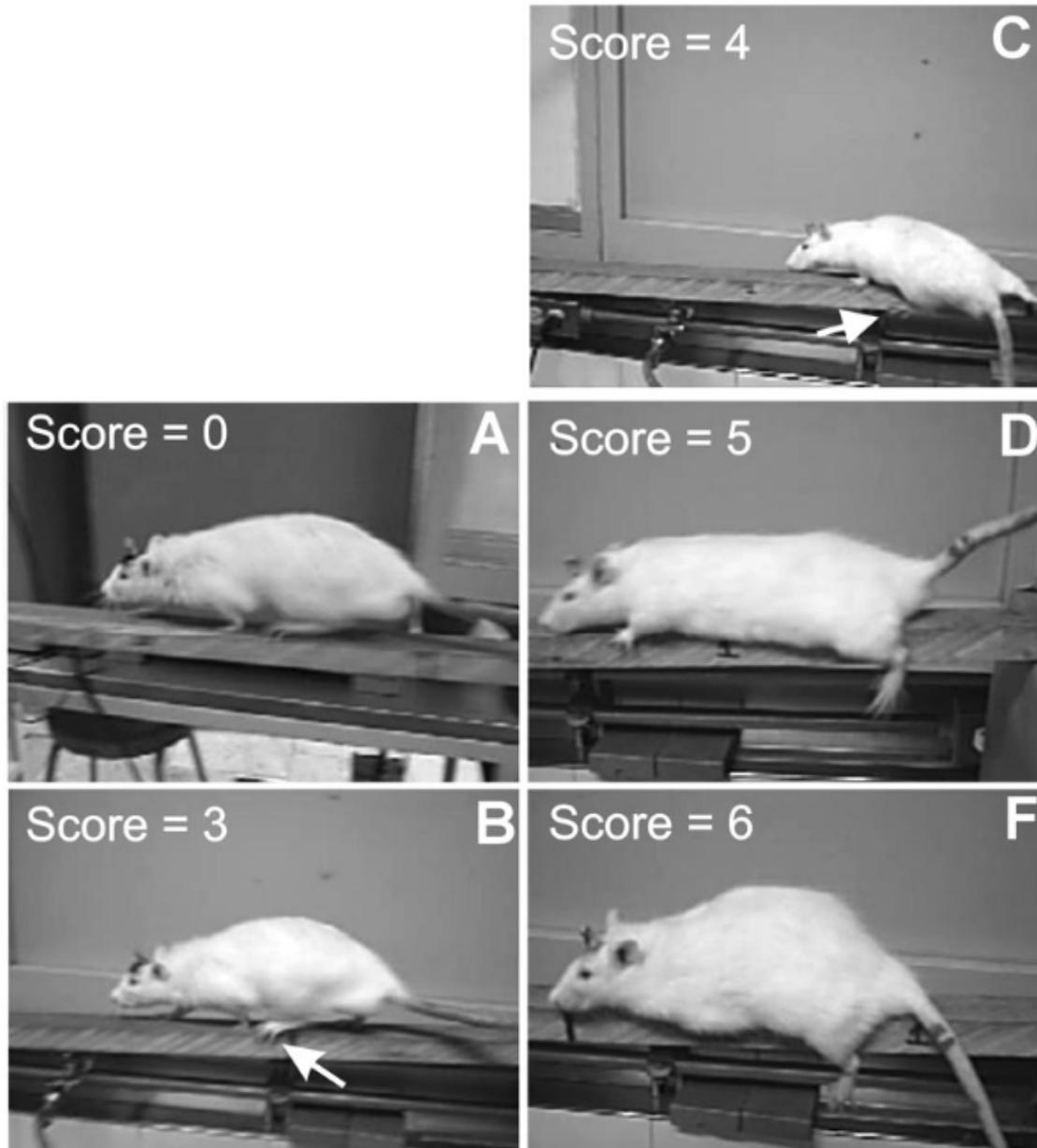


Figura 6. Escala usada para la cuantificación del déficit motor mediante la prueba de la viga de equilibrio. Se evalúa en una viga de madera (2 metros de largo, 2.5 cm de ancho) dividida en 4 secciones. Las ratas sin déficit obtienen una puntuación de 0 (a). Si el animal amplía su base y presenta cuatro dedos fuera de la viga bilateralmente una puntuación de 1 y 2 si cojea con alguna de sus extremidades posteriores (hipotonía). Un animal con al menos 3 resbalones y/o 4 dedos fuera de la viga (unilateralmente) recibe una puntuación de 3 (b) mientras que animales con caídas o al menos 3 resbalos recibieron una puntuación de 4 (c). Si la rata que arrastra un miembro recibe un 5 y aquellas que incapaces de caminar reciben un 6 (f). Las puntuaciones recibidas cada sección se suman y se obtiene la puntuación motora final. Los comportamientos que alcanzan una puntuación de 1 o 2 no son mostrados dado que no pueden ser apreciados en una imagen fija.

RESULTADOS.

I. EFECTOS DE LA ABLACIÓN CORTICAL MOTORA Y SOBRE EL DÉFICIT MOTOR, SOMATOSENSORIAL, EL LARGO, ANCHO, ÁNGULO DE LA ZANCADA Y CONTENIDO DE NORADRENALINA EN PUENTE Y CEREBELO.

Después de que los cortes cerebrales coronales fueron procesados, se observó que la cavidad correspondiente a la lesión inicia a -1.6 mm con referencia a bregma (FIGURA 7A) alcanzó su volumen máximo entre -2.56 a 2.80mm (FIGURA 7B) y terminó entre 3.14 mm y 3.60mm (FIGURA 7C) cubriendo la representación cortical de los miembros posteriores por completo, de acuerdo a Hall y Lindholm (1974).

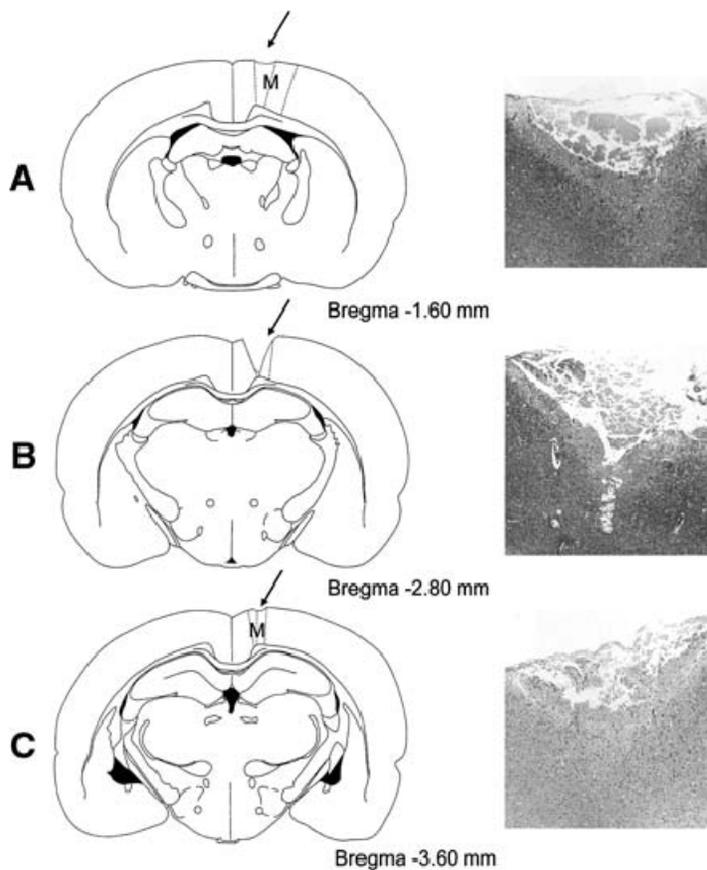


Figura 7. Representación esquemática mostrando la extensión de la lesión (izquierda) y microfotografías (10x) tomadas de las zonas equivalentes en un corte típico (derecha). La cavidad fue delineada en los esquemas equivalentes tomados del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson [27]. En ambos esquemas y microfotografías se observa que la lesión fue circunscrita al área representativa del córtex motor de los miembros posteriores. En A y C el borde del córtex motor primario está afectado (M), mientras que en el área lesionada, una porción del córtex somatosensorial (B) fue igualmente afectada. Sin

embargo, la escasez de efectos somatosensoriales sugiere que el tamaño de la lesión en dicha área no es significativo.

La valoración sensitiva no mostró ningún cambio adicional y por ese motivo los datos no se muestran. En contraste, la valoración motora mostró un notorio y sostenido incremento en el déficit motor en animales lesionados. Dichos cambios comenzaron 3 horas después de la cirugía ($P \leq 0.001$) logrando una puntuación máxima a las 5 ($P \leq 0.0001$) y 6 ($P \leq 0.0001$) horas después de que la lesión fuera realizada (FIGURA 8).

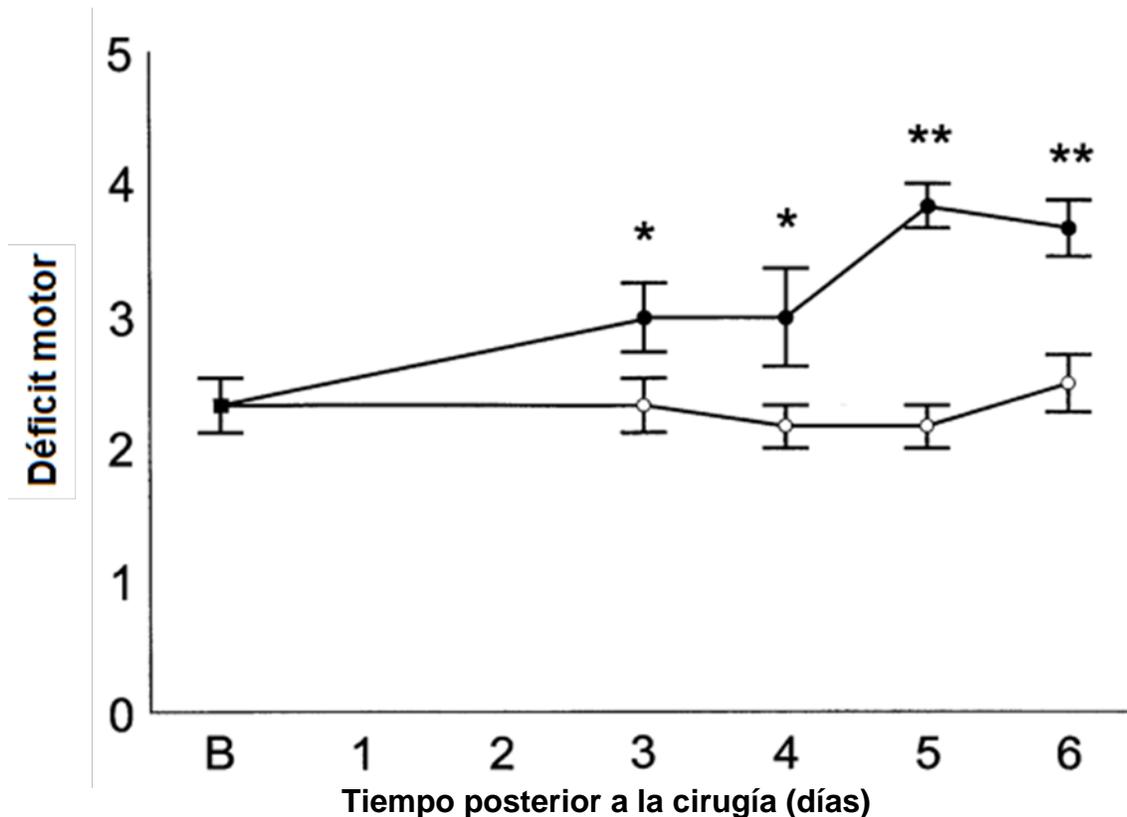


Figura 8. Déficit motor temprano encontrado en ratas lesionadas y comparado con las ratas SA. Después de 3 horas posteriores a la cirugía, los animales lesionados mostraron importantes incrementos en el déficit motor. Tales efectos fueron observados por 4 horas hasta que pasaron 6 horas posteriores a la cirugía. Los datos son expresados como media \pm s.e.m. ■ Registro basal (B) realizado tanto a ratas SA como a ratas AC; ○ Ratas simuladamente operadas (SA); ● Ratas lesionadas (AC); Análisis U de Mann-Whitney * $P < 0.001$, ** $P < 0.0001$.

La actividad motora espontánea no mostró ningún cambio significativo. Por otro lado, el análisis de la huella impresa mostró que los animales lesionados tuvieron una disminución significativa en la longitud de la zancada después de 6 horas ($-8.00\% \pm 2.4$; $P < 0.001$; FIGURA 9A) con un incremento concomitante en el ángulo de la

zancada ($22.11\% \pm 4.65$; $P < 0.003$; FIGURA 9B), mientras que el ancho no mostró ningún cambio significativo. Como se muestra en las figuras, la recuperación se observó 24 horas después de la lesión ya que el promedio del porcentaje de cambio con respecto al basal no fue significativo cuando el grupo sham1 fue comparado con el AC. A partir de aquí, la recuperación fue sostenida por 48 horas posteriores a la lesión.

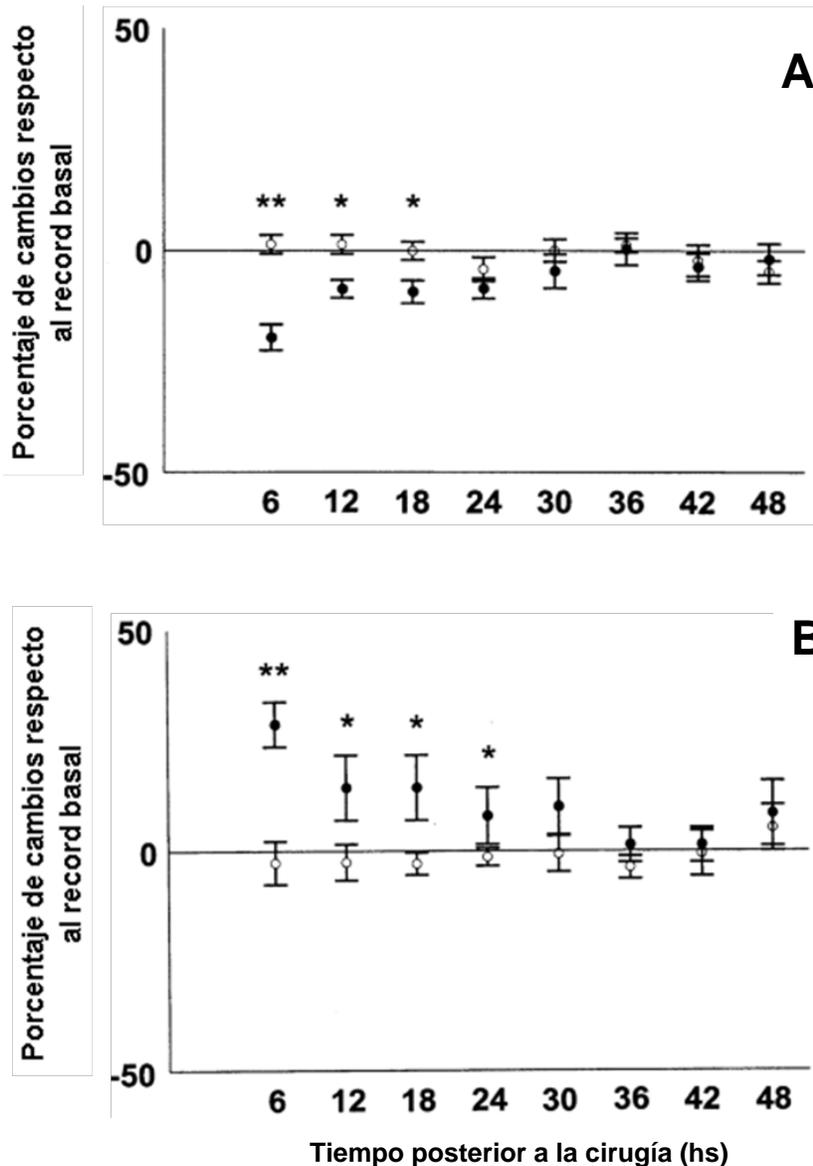


Figura 9. Parámetros medidos en la huella impresa. Dado que el ancho del paso no mostró ninguna diferencia significativa, tales datos no son presentados (A) porcentaje de cambios con respecto al registro basal en la longitud medida cada 6 horas durante 48 horas posteriores a la cirugía. Se observó decremento después de 6 horas en las ratas RAC. La recuperación se observó 24 horas posteriores a la lesión y se mantuvo durante las siguientes 24 horas. Los datos son expresados como media \pm s.e.m. U de Mann-Whitney (* $P < 0.05$, ** $P \leq 0.01$). ○ ratas SA; ● ratas RAC. (B) Porcentaje de cambios con

respecto al basal en el angulo del paso, donde un incremento significativo se observo 6 horas posteriores a la cirugía. Se observó la recuperación 30 horas posteriores a la cirugía, aunque después de las 24 horas se observo una diferencia marginalmente significativa. La recuperación se prolongo por al menos 48 horas. Los resultados son expresados como media +_ s.e.m. U de Mann-Whitney (*P< 0.005, **P≤0.01). ○ ratas SA; ● ratas RAC.

Cuando la media del contenido total de NA fue analizada en ambos lados del puente, se encontró que 6 horas después de la cirugía las ratas AC mostraron incremento significativo (en ng/g de tejido fresco) de NA (9.76 ± 0.72) en el hemisferio derecho cuando fueron comparadas con las SA después de 6 horas de la cirugía (6.54 ± 0.79 sin muestra gráfica). Este incremento también se observó en las ratas RAC (6.32 ± 0.71) cuando se compararon con las sham después de 48 horas de la cirugía (6.76 ± 0.87). El mismo patrón de cambio se encontró en el hemisferio izquierdo ($P \leq 0.017$; FIGURA 10). No hubo diferencias significativas entre los niveles de NA encontrados en ambos lados del puente en cada una de las ratas.

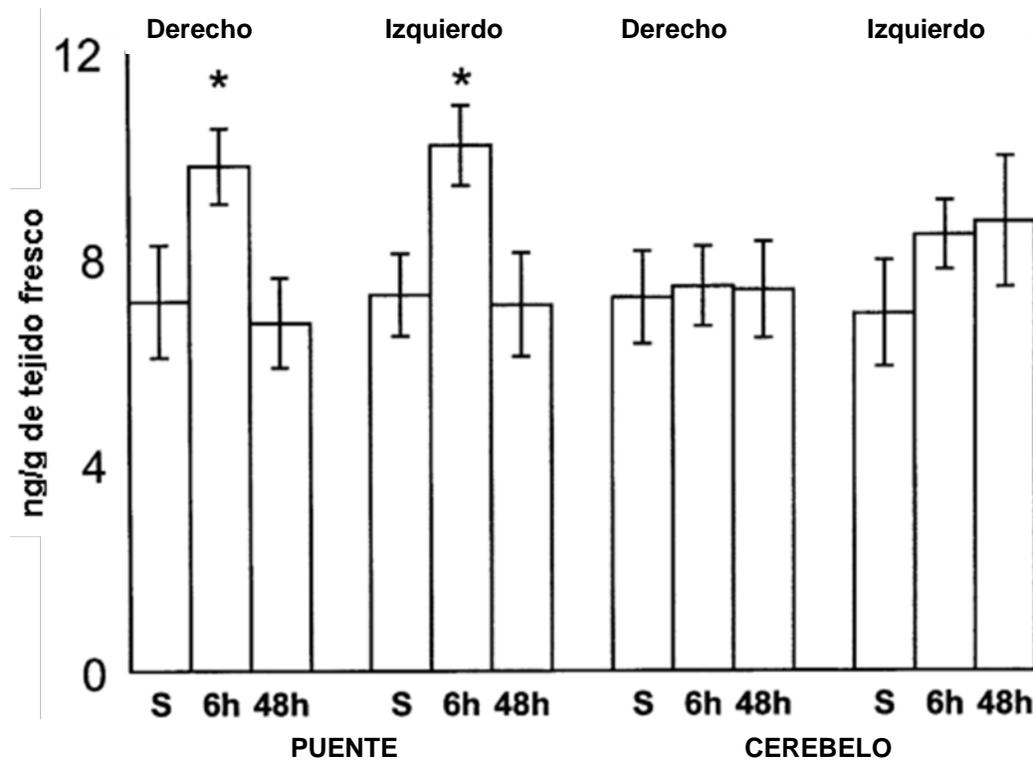


Figura 10. Promedio del contenido total de NA pontina y cerebelar encontrada en ratas Sham1 (S), ratas AC que fueron sacrificadas 6 horas después de la ablación (6h) y ratas RAC sacrificadas 48 horas posteriores a la lesión (48h), determinados en los lados

derecho e izquierdo del puente y cerebelo. Se muestra un incremento de NA en las ratas AC (6h) mientras que las ratas RAC (48h) mostraron niveles similares a las SA (ANOVA simple, $*P<0.05$). Por otro lado no se detectaron diferencias significativas en los hemisferios cerebelares (Derecho $P=0.791$, izquierdo $P=0.522$). Los datos son expresados como media \pm s.e.m.

II. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPARÉNQUIMAL DE $FeCl_2$ SOBRE EL DÉFICIT MOTOR EVALUADO CON LA VIGA DE EQUILIBRIO, EL LARGO, ANCHO, ÁNGULO DE LA ZANCADA Y CONTENIDO DE NORADRENALINA EN PUENTE Y CEREBELO.

Cuando los cortes cerebrales se observaron bajo el microscopio, se observó que la trayectoria de la aguja a través de la cual el CSF o la solución de $FeCl_2$ fue administrada, estaba localizada en el córtex motor a una profundidad de aproximadamente 1mm (FIGURA 11)

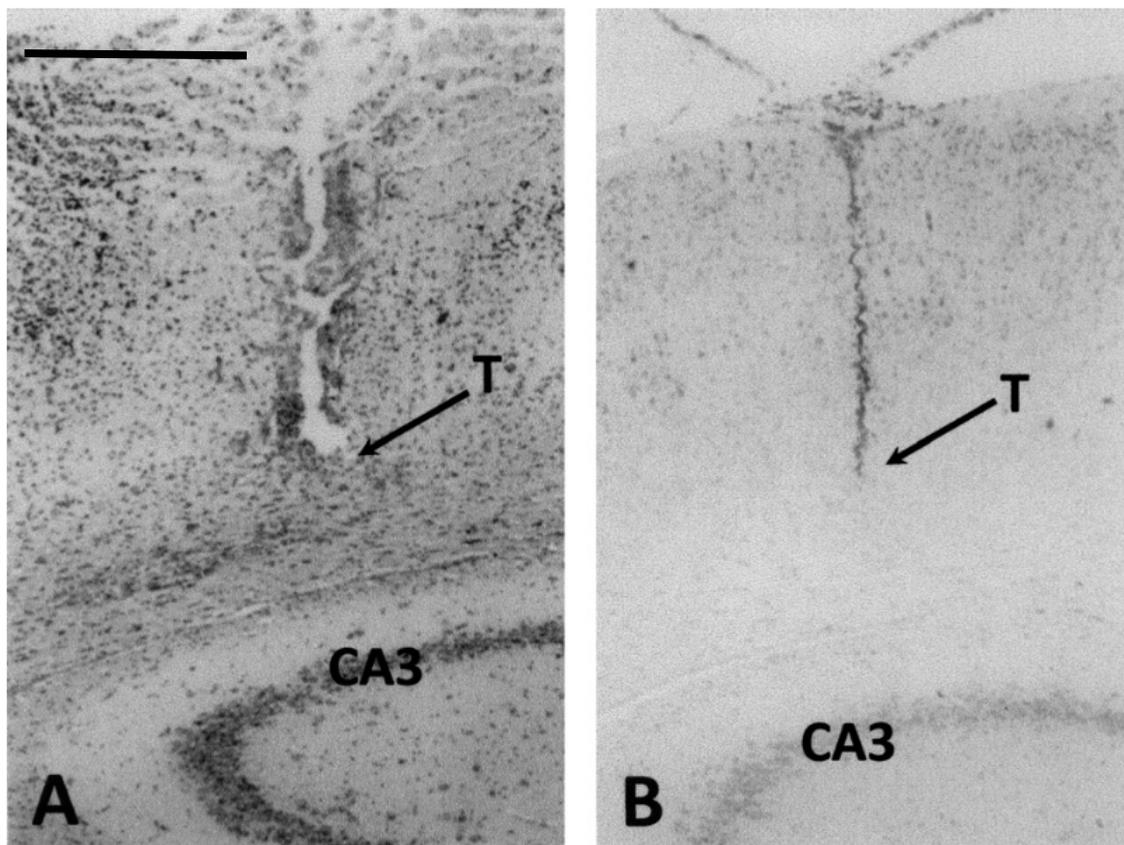


Figura 11. Fotomicrografía mostrando el sitio de microinyección en el córtex de dos animales distintos (A) Corte representativo de una rata lesionada a dos días posteriores a

la inyección. (B) Corte representativo de una rata recuperada a 20 días posteriores a la lesión. Tinción de Nissl (10x) CA3: CA3 del hipocampo, T: punta de la cánula. La barra de escala en la esquina del lado izquierdo superior representa 500 μm .

Por otro lado, las puntuaciones obtenidas en la viga de equilibrio fueron significativamente más altas en el grupo de ratas RF que las que se obtuvieron en el grupo de ratas SB al día 1 ($P=0.0023$), 2 ($P=0.0001$), 3 ($P=0.0009$), 4 ($P=0.0010$), 5 ($P=0.0001$), 6 ($P=0.0126$), 7 ($P=0.0450$), 8 ($P=0.0014$) y 9 ($P=0.0019$). Una vez que la recuperación se alcanzó a los 10 días, ésta se mantuvo durante los siguientes 10 días después de alcanzada (FIGURA 12).

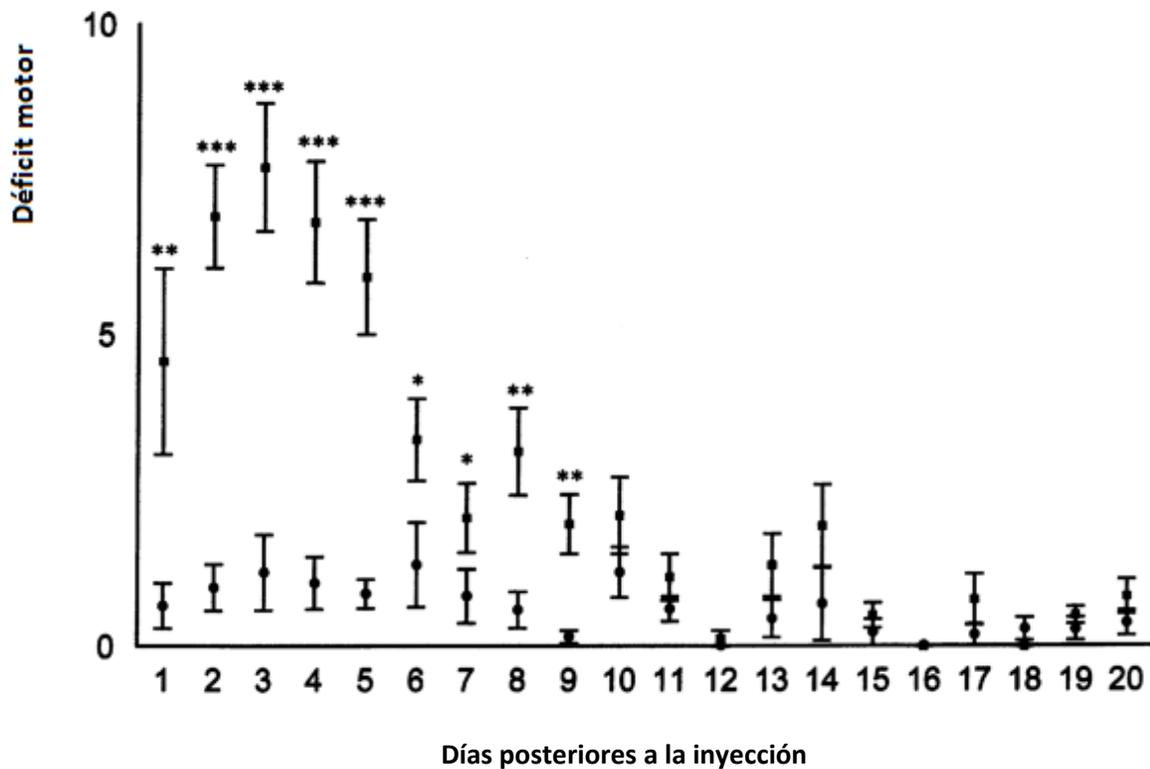


Figura 12. Puntuaciones obtenidas de la prueba de la viga de equilibrio en ratas de sham (círculos) y en ratas lesionadas (cuadrados). El déficit motor se incrementó desde el primer día de lesión en ratas lesionadas y la recuperación se logró en el décimo día. Esta recuperación se sostuvo durante los próximos diez días. Las comparaciones fueron realizadas utilizando la prueba de contraste U de Mann-Whitney ($*P<_0.05$, $**P<_0.01$, y $***P<_0.001$).

Con respecto al análisis de la huella impresa (FIGURA 13), los animales dañados mediante administración intraparenquimal de FeCl₂ mostraron un aumento significativo en el largo de la zancada durante los días 2-3 después de la inyección (12-18%; $p \leq 0.0086$) y un decremento en el ángulo de la zancada en los días 2 (-5.24 ± 3.08; $p \leq 0.013$), 3 (-8 % ± 3.13; $p \leq 0.021$), 4 (-5.5 % ± 2.87; $p \leq 0.014$) y 5 (-3.3% ± 1.19; $p \leq 0.007$).

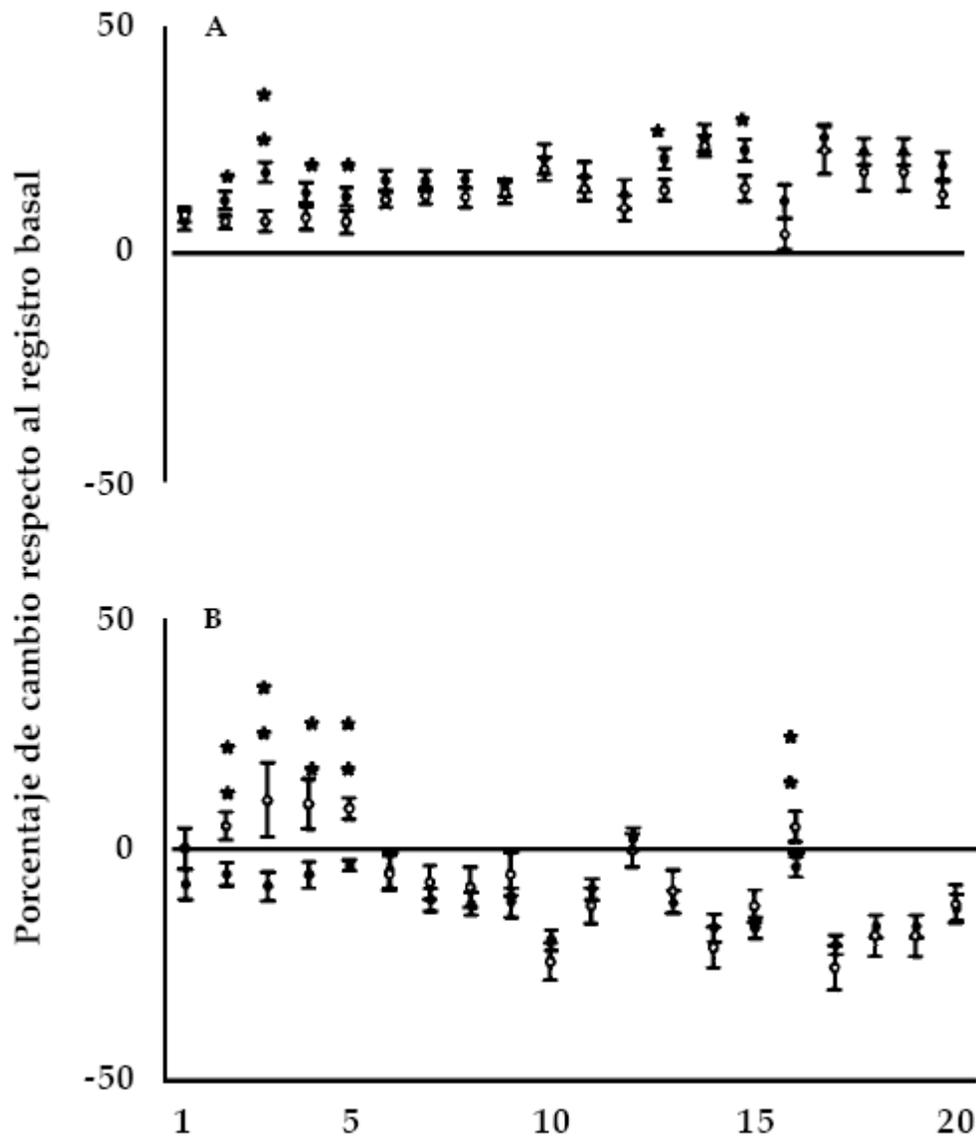


Figura 13. Parámetros medidos en la huella impresa. Los datos referentes al ancho de la zancada no se presentan debido a que no mostraron diferencias significativas. En

términos generales, se observa una variabilidad muy amplia en los valores del largo y el ángulo en ambos grupos (A) porcentaje de cambio con respecto a la línea base en la longitud de la zancada, medida cada 24 horas durante 20 días post-lesión. Se observa un incremento importante después de dos días y la recuperación sobrevino 15 días después de la lesión, aunque se observaron unas secuelas tardías en los días 13 y 15. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. U Mann-Withney (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$) ○ grupo SB; ● grupo AC. (B) Porcentaje de cambio con respecto a la línea base en el ángulo de la zancada, donde se observó un decremento significativo dos días después de la lesión. La recuperación se observó a los seis días post-lesión, aunque también se observó una secuela tardía en el día 16. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. U Mann-Withney (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$) ○ grupo SB; ● grupo AC.

Los niveles totales de NA en el puente fueron drásticamente reducidos a niveles indetectables en ambos lados de esta estructura en el grupo de ratas Fe (Lado derecho F2.18=5.24 P=0.0161; FIGURA 14), mientras que en el cerebelo el contenido de NA fue significativamente más bajo en ratas Fe y los niveles de ratas RFe no fueron significativamente diferentes cuando fueron comparadas con los animales del grupo sham2 (lado derecho F2.18 =10.20, P=0.0005; lado izquierdo F2.18=6.12, P=0.0182; Figura 15).

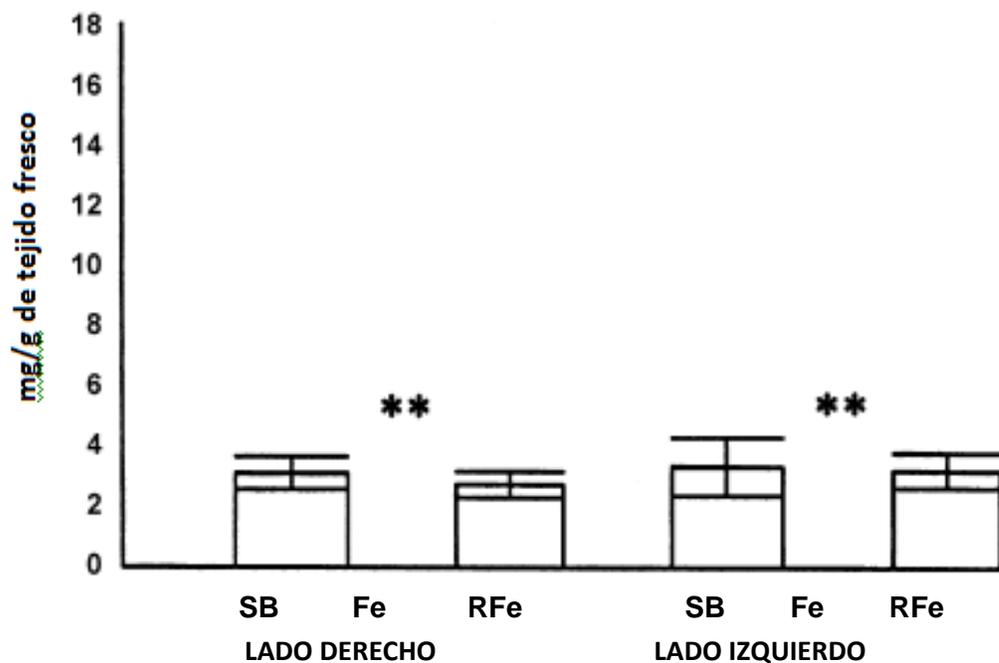


Figura 14. Contenidos totales de noradrenalina (NA) encontrados en el puente. Se observó una disminución importante en ambos lados del puente, en las ratas lesionadas y sacrificadas dos días posteriores a la inyección de FeCl₂, mientras que los niveles de

NA fueron similares en ratas SB y ratas recuperadas que fueron sacrificadas 20 días posteriores a la inyección de FeCl₂ (post hoc Tukey **P≤0.01).

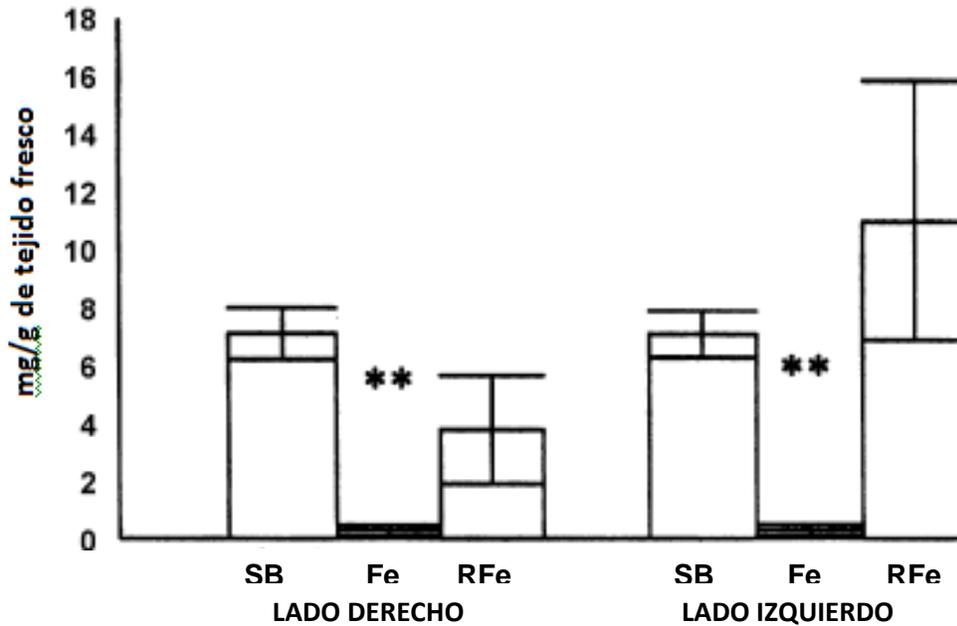


Figura 15. Contenido de noradrenalina (NA) cerebelar que muestra disminución de NA en ambos hemisferios cerebelares en ratas lesionadas y sacrificadas 2 días después de la inyección de FeCl₂ (Fe) mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos SB y recuperados (RFe), que fueron sacrificados a 20 días posteriores a la inyección de FeCl₂ (post hoc Tukey **P<_0.01).

Los niveles de productos lipídicos fluorescentes en ambos lados del puente fueron hallados elevados en los animales del grupo Fe en comparación con los de los grupos SB y Rfe (lado derecho p=0.0207; lado izquierdo p=0.0161; FIGURA 16). Por otro lado, ningún cambio en los productos lipídicos fluorescentes fue observado a nivel cerebelar (datos no mostrados).

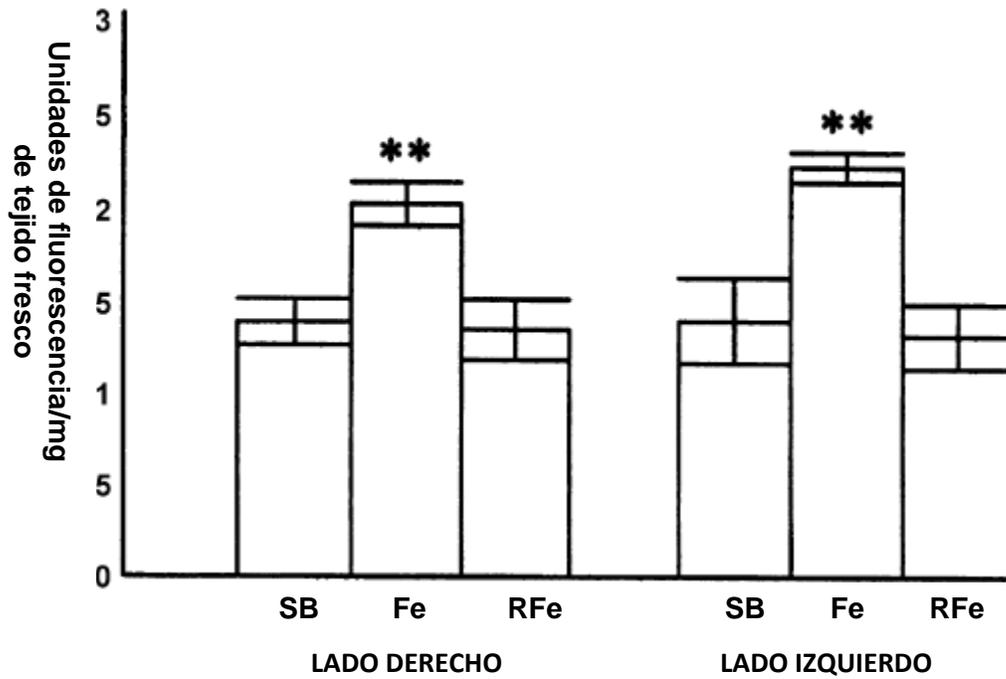


Figura 16. Productos lipídicos fluorescentes encontrados en ambos lados del puente. Los niveles se observan incrementados significativamente en las ratas sacrificadas dos días después de la lesión (Fe), mientras que en las ratas RFe no se observa ningún cambio con respecto al control SB. Tuckey (** $p < 0.01$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

I. MODELO DE LESIÓN CORTICAL AGUDA INDUCIDO POR ABLACIÓN.

El análisis de la huella impresa mostró que el desempeño motor se recupera después de 24 horas a diferencia de lo reportado en la mayoría de los artículos relacionados, en los que la mejoría motora se logra de 4 a 6 días posteriores a la lesión (Brailowsky y cols., 1986a) Esto puede ser debido a la extensión de la lesión que en este trabajo se practicó a los animales delimitando el daño al área motora y evitando el del área somatosensorial. Esta es una ventaja considerable porque nos permite estudiar los mecanismos de recuperación en un corto periodo de tiempo. En este contexto, el análisis de la huella impresa y la valoración temprana mostraron que cuando las ratas expresaron los efectos más fuertes de la lesión, los niveles totales de NA pontina fueron elevados y cuando los animales se recuperaron estos niveles se hallaron similares a los encontrados en las ratas sham.

Se sabe que la inervación desde el locus coeruleos (LC) al córtex motor (MCX) es ipsilateral (Steindler, 1981), por lo que se espera que una lesión en el MCX produzca un efecto ipsilateral en el LC. De cualquier manera, se encontró un incremento de NA en ambos lados del puente. Existe evidencia de que los efectos conductuales de la lesión cortical motora resulten de una depresión funcional en áreas cerebrales remotas intactas pero relacionadas con el sitio lesionado. Si el incremento de NA encontrado es parte de alguna depresión funcional, se posible que representen un mecanismo de autoinhibición nodradrenérgica pontina. Las observaciones farmacológicas sugieren que la inhibición de NA liberada en células diana postsinápticas puede ser mediada por los adrenoreceptores alfa-2 (Washburn y Moises, 1989; Nasser y Minneman, 1987) ampliamente distribuidos en las neuronas del LC. Así, el enlace de NA a estos receptores en el LC, cuyos niveles se encontraron elevados en este estudio, podría producir el decremento de liberación de NA en el cerebelo, como se ha descrito después de la lesión del MCX (Krobert y cols., 1994). Específicamente, el receptor subtipo alfa-2A podría estar involucrado, ya que se encontró en el 100% de las neuronas del LC de las ratas (Smeets y Gonzalez, 2000) y se ha reportado que un

agonista de este receptor inhibió la liberación de NA en un 96% (Bucheller y cols., 2002).

La acción inhibitoria de la NA también se ha observado en otras áreas del cerebro, tales como la inhibición de la acetilcolina en el núcleo tegmental (Hobson y McCarley, 1977). Aunque encontramos que el contenido total de NA se altera 6 horas después de la lesión, en este trabajo se provee de evidencia de que la inhibición remota del puente podría empezar tan pronto como pasan 3 horas posteriores a la realización de la lesión cerebral, ya que las evaluaciones motoras tempranas mostraron déficits motores durante este periodo de tiempo. Sin embargo, una limitación del método empleado para la evaluación motora temprana es que la valoración es menos cuantitativa que el análisis de la huella impresa, la cual es una valoración a largo plazo. Esta es la razón por la que fue necesario el usar ambos tests complementarios.

Por otro lado, no está claro cómo el daño unilateral cortical resulta en un incremento bilateral de los niveles totales de NA en el puente, ya que la inervación entre el LC y el córtex es predominantemente ipsilateral (Steindler, 1981). Es posible que los efectos de la lesión unilateral en el MCX ejerza una influencia en ambos lados del puente (Krobert y cols., 1994). En cambio, la inervación del LC hacia el cerebelo es bilateral (Room y cols., 1981) y los efectos de la lesión cortical sobre el cerebelo podrían dirigir a efectos bilaterales retrógrados dentro del LC. Sin embargo, no observamos cambios en los niveles de NA cerebelar. La mayoría de los estudios han mostrado que la NA cerebelar está involucrada en los mecanismos que dirigen la recuperación. Se ha reportado decremento de NA cerebelar después de la lesión cortical (Boyeson y Krobert, 1992; Krobert y cols., 1994) y estos niveles vuelven a los valores normales cuando se administra anfetamina (Room y cols., 1981). También se ha reportado que las infusiones de NA cerebelar facilitan la recuperación después de una lesión en el córtex sensoriomotor. Estos resultados apoyan la idea de que el cerebelo cuenta con un mecanismo mediado por la NA para lograr la recuperación después de una lesión cerebral.

La ausencia de cambios en el contenido de NA cerebelar en nuestros experimentos sugiere que la actividad noradrenérgica cerebelar relacionada con la recuperación después de la ablación cortical motora esta confinada a regiones discretas, tales como

el córtex cerebelar. Se sabe que las porciones ventrales y dorsales del LC inervan a todas las neuronas del córtex cerebelar y en menor medida, a los núcleos cerebelares profundos (Schambra y cols., 2005; Schweighofer y cols, 2004).

Nuestros resultados sugieren que la diasquisis está involucrada porque se observa la presencia de una lesión cerebral circunscrita, una base neuronal para la depresión funcional, la participación de una estructura remota relacionada con el sitio de lesión (el puente), relaciones anatómicas entre el puente la la corteza y el proceso es reversible (Feeney y Baron, 1986), como fue observado por el análisis de la huella impresa y el contenido de la NA después de 48 horas de la cirugía de lesión. Así, demostramos que la NA pontina se incrementa en animales después del daño cerebral y esto es concomitante con un incremento en el déficit motor. Por otro lado encontramos que cuando las ratas se recuperan y el desempeño motor se vuelve norma, los animales mostraron niveles de NA pontina muy similares a aquellos encontrados en ratas sham después de 48 horas de la cirugía, sugiriendo la existencia de un papel importante del puente en la inhibición cerebelar después de la lesión cortical, previamente reportada por otros. Por lo tanto, la falta de efectos en el contenido de NE cerebelar abre la necesidad de buscar áreas cerebelares específicas relacionadas con la recuperación posterior a la lesión cortical cerebral.

La relevancia de este estudio acerca de los mecanismos bioquímicos que llevan hacia la recuperación después de una lesión cerebral es que esta información es un factor determinante para el desarrollo de estrategias farmacológicas que mejoren la recuperación en humanos. Debe notarse que los resultados de la experiencia clínica son muy similares a aquellos observados en animales experimentales (Goldstein, 2000) sugiriendo que los mecanismos observados en la investigación básica son comparables entre la rata y el hombre. Es por esto que debería de considerarse el uso clínico agonistas y antagonistas noradrenérgicos tales como antidepresivos y ansiolíticos en humanos después de un evento cerebrovascular o traumatismo craneoencefálico, ya que estos fármacos podrían aliviar o extender la depresión funcional remota, facilitando o dificultando la recuperación funcional. Se requiere de más estudios con el objetivo de dilucidar con detalle los mecanismos subyacentes a la recuperación cerebral tras la lesión. Particularmente, el papel específico del LC en la depresión funcional

noradrenérgica debe ser aclarado. Por ahora, con este estudio se ha provisto de evidencias de que el incremento de NA pontina está íntimamente relacionada con el déficit motor producido por una lesión cortical motora. De cualquier manera es necesario proveer evidencias sobre una correlación más precisa entre la NA y la recuperación usando otros métodos neuroquímicos, tal como el muestreo de microdiálisis in vivo.

II. MODELO DE LESIÓN CORTICAL CRÓNICA INDUCIDA POR INYECCIÓN INTRAPARÉNQUIMAL DE FeCl₂.

Hay una variedad de generadores de peroxidación lipídica (PL) en el cerebro, tales como el cobre (Becaria y cols., 2006), el zinc (Frazzini y cols., 2006), el ozono (Escalante-Membrillo y cols., 2005) y el hierro (Halliwell y Gutteridge, 1997) y se ha demostrado que las lesiones oxidativas en las sinapsis pueden alterar el transporte, la liberación y la recaptura de neurotransmisores en las neuronas produciendo disfunciones del sistema nervioso central (SNC) (Rafalowska y cols., 1989). Una inyección intraparenquimal de FeCl₂ induce un cambio sistemático en la expresión genética, aún en sitios remotos del cerebro (Hironishi y cols., 1999). Existen algunas líneas de evidencia que sugieren que el hierro férrico como el FeCl₂ (en vez del hierro ferroso) tiene una elevada actividad pro oxidante (Maharaj y cols., 2003). Nuestros resultados muestran que la PL se incrementa en el puente 48 horas después de la administración de FeCl₂ en la MCX, por lo que se propone que la PL es una consecuencia directa de la PL producida en la MCX, ya que el radical superóxido (O₂⁻) generado puede propagarse desde el sitio de su transformación a otras áreas remotas y conducir hacia la disfunción neuronal (Halliwell y Gutteridge, 1984; Obata, 2002; Yamasoba y cols., 1999).

El estrés oxidativo puede ser el responsable de la dramática caída de NA observada en el puente de las ratas lesionadas. Como ya se ha mencionado, hay relaciones anatómicas entre la MCX y el puente (Waterhouse y cols., 1983). El LC es el principal reservorio noradrenérgico del SNC (Aston-Jones y cols., 2000) y está localizado en el puente. Es posible que la PL que se origina en la MCX conduzca al daño de las proyecciones de los axones del LC. Este daño podría afectar al soma por regeneración

retrograda y modificar la producción de NA en las neuronas del LC un tiempo después de producido el daño, se encargarían de la producción de proteínas estructurales con el fin de reconstruir las terminales muertas. Se encontró también que el agotamiento de NA se refleja también en el cerebelo, aunque en la ausencia de PL en esta estructura. Se ha reportado en otros estudios la disminución en el contenido total de NA cerebelar posterior a la lesión cerebral (González-Piña y cols., 2003; Krobert y cols., 1994), sugiriendo que estos efectos son mediados por alteraciones en el puente, dado que las relaciones anatómicas entre el puente y el cerebelo han sido bien establecidas (Steindler, 1981). Todas estas observaciones coinciden con un incremento en el déficit motor, el cual vuelve a la normalidad 20 días después de haberse realizado la lesión. La PL y el contenido de NA en el cerebelo y el puente son similares entre las ratas sham2 y en las recuperadas. Es posible que persista algún daño en la MCX de las ratas recuperadas ya que las observaciones histológicas mostraron que la introducción de la aguja llevó a un trauma tisular. De cualquier manera, las funciones del puente y del cerebelo parecen estar reestablecidas y esto correlaciona con la recuperación de la función. En este modelo también se observó una depresión remota o diasquisis posterior a la lesión producida por FeCl₂ que también afectó a ambos lados del puente y el cerebelo. La diasquisis ha sido utilizada para explicar los efectos conductuales de una lesión cortical que afecta al cerebelo (Serteser y cols., 2001; Thomas y cols., 2000). Aunque también se han descrito cambios plásticos en zonas adyacentes al sitio de la lesión y también en el cerebelo (Levin y cols., 1995) y el puente (González-Piña y cols., 2006), los mecanismos involucrados todavía no están bien comprendidos. Nuestros resultados sugieren que dichos mecanismos pueden estar mediados por estrés oxidativo que se produce posterior a la lesión y en el caso de la lesión de MCX, los efectos cerebelares podrían explicarse por una depresión a nivel pontino.

Como se ha mencionado, es importante continuar con estudios sobre los mecanismos que subyacen a la recuperación funcional después del daño cerebral, pues permitirán dilucidar los mecanismos que conducen a la recuperación y desarrollar terapias farmacológicas que mejoren el beneficio de la rehabilitación para pacientes hemipléjicos y afásicos.

III. COMPARACIÓN ENTRE AMBOS TIPOS DE LESIÓN.

Los resultados obtenidos muestran que las variaciones en las lesiones cerebrales inducen efectos diferenciales sobre la NA pontina y cerebelar, además de los parámetros de la huella. En el caso de la ablación cortical, el contenido de NA se elevó 6 h después de la cirugía y cuando los animales se recuperaron, la NA pontina se encontró en niveles similares a los hallados en las ratas Sham después de 48 h de la cirugía. Por otro lado, la NA se halló completamente agotada en el puente dos días después de que los animales fueron dañados con FeCl₂, mientras que después de 20 días de realizado el daño los niveles de NA se encontraron normales. Esto se observó en ambos lados del puente. Se sabe que la inervación del LC a la MCx es ipsilateral 14, por lo que se esperaría que un daño en la MCx produzca un efecto ipsilateral sobre el LC. Sin embargo, los cambios de NA se observaron en los dos lados de puente, lo que sugiere la existencia de una retroalimentación entre ambos lados pontinos. Hay fuerte evidencia de que los efectos conductuales del daño cortical motor resultan de una depresión funcional en áreas cerebrales remotas e intactas, pero relacionadas con el sitio dañado, concepto conocido como diasquisis (Sertser y cols., 2001). Esto parece ser aplicable en el caso de una lesión crónica donde la NA disminuye cuando la secuela motora es más alta. En el caso de la lesión aguda (ablación cortical), el incremento de NA en el puente pudiera también ser parte de esa depresión funcional, ya que la NA podría poseer un mecanismo autoinhibitorio dentro del puente como ha sido propuesto previamente (González- Piña y cols., 2006).

Nuestros resultados sugieren que la diasquisis está involucrada, sin importar los mecanismos implicados, debido a que ambos modelos de lesión representan un daño cerebral circunscrito, característica añadida a la existencia de una base neuronal para explicar esta depresión funcional, la participación de una estructura remota relacionada con el sitio de la lesión (el puente), relaciones anatómicas entre el puente y la corteza, y además el proceso es reversible (Feeney y Baron, 1986). En este contexto, los estudios farmacológicos sugieren que la inhibición de la liberación de NA en las células post-sinápticas podría estar mediada por los adrenoceptores α_2 (Washburn y Moises, 1989; Nasseri y Minneman, 1987) ampliamente distribuidos en las neuronas del LC. De esta manera, el enlace de la NA pontina a estos receptores podría producir la disminución en

la liberación cerebelar de NA reportada después del daño en la MCx (Krobert y cols., 1994) Específicamente, el receptor involucrado podría ser el $\alpha 2A$, que se encuentra en 100% de las neuronas de LC de la rata (Smeets y González, 2000) y se ha reportado que un agonista $\alpha 2$ inhibe la liberación de NA en 96%.²⁶ La acción inhibitoria de NA también ha sido observada en otras áreas cerebrales, tal como la inhibición colinérgica mediada por NA en los núcleos tegmentales (Hobson y McCarley, 1977). Entonces, nuestros resultados muestran que se está frente a dos mecanismos de díasquisis: Uno podría estar mediado por la depleción de la NA pontina, quizá como consecuencia de la reconstrucción de los circuitos dañados por el estrés oxidativo derivado de la administración de FeCl₂. Es posible que en este caso las neuronas noradrenérgicas sinteticen proteínas estructurales en lugar de NA, para reconstruir los axones dañados. Por otro lado, el daño agudo produce un incremento de NA que también podría dirigir a la inhibición, esta vez mediado por los receptores alfa. Ambos mecanismos producen alteraciones motoras que son consistentes con la evaluación motora. El análisis de la huella mostró que el largo de la zancada disminuyó en los animales del grupo AC, pero se incrementó en los animales Fe, cuando los niveles de NA se incrementaron y disminuyeron, respectivamente. También se observó que el ángulo de la zancada se incrementó en los animales CA mientras que disminuyó en las ratas Fe. Entonces es aparente una relación negativa entre el contenido de NA pontina y el largo de la zancada, mientras que una relación positiva entre el contenido de NA y al ángulo de la zancada parece estar presente (Bueno- Nava y cols., 2008).

No está claro cómo el daño cortical unilateral resulta en un incremento bilateral de NA pontino, ya que la inervación entre el LC y la corteza es predominantemente ipsilateral (Steindler, 1981). Es posible que los efectos del daño unilateral en la MCx tengan una influencia en ambos lados del puente (Krobert y cols., 1994) En cambio, la inervación del LC al cerebelo es bilateral (Room y cols., 1981) y los efectos de la lesión de MCx sobre el cerebelo pueden llevar a efectos retrógrados bilaterales dentro de las neuronas del LC. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles cerebelares de NA. La mayoría de la literatura ha mostrado que NA cerebelar está involucrada en los mecanismos que participan en la recuperación, por ejemplo, una disminución NA cerebelar se ha reportado después de la lesión cortical (Boyeson y cols., 1992; Krobert

y cols., 1992) y esos niveles retornan a los valores normales cuando se administra Anfetamina (Goldstein, 1999; Boyeson y cols., 1992). También se ha reportado que las infusiones de NA en el cerebelo facilitan la recuperación después del daño cortical sensoriomotor (Boyeson y cols., 1992). Estas observaciones apoyan la existencia de un mecanismo cerebelar mediado por NA, mecanismo que lleva a la recuperación después del daño cerebral (Ríos- Romenets y cols. 2007). La ausencia de cambios en el contenido de NA cerebelar encontrada en ratas con ablación sugiere que la actividad noradrenérgica en el cerebelo relacionada con la recuperación está delimitada en regiones discretas como podría ser la corteza cerebelar. Se sabe que las porciones dorsal y ventral del LC inervan a las neuronas de la corteza cerebelar y, en menor extensión, a los núcleos cerebelares (Schambra y cols., 2005; Schweighofer y cols., 2004). Sin embargo, la extensión del daño podría amplificarse en el caso de una lesión crónica, debido a que las ratas dañadas con hierro mostraron una importante disminución de NA después de dos días post-lesión. De esta forma, en este trabajo se demuestra que las alteraciones motoras dependen del tipo de daño y que la inhibición funcional remota podría estar mediada por efectos diferenciales sobre la NA pontina. Por otro lado, se encontró que cuando los animales se recuperan del daño motor, muestran niveles de NA pontina muy similares a los encontrados en ratas Sham 48 h después de la cirugía, sugiriendo un papel importante del puente en la inhibición cerebelar después del daño cortical. Asimismo, la carencia de efectos sobre el contenido cerebelar de NA después de la ablación abre la necesidad de investigar áreas cerebelares específicas relacionadas con la recuperación después del daño cortical. Esto también aplica a la dimensión cerebelar global observada después del daño inducido por FeCl₂, ya que una depleción generalizada de NA podría dirigir a una disfunción conductual mayor, tales como síntomas atáxicos y alteraciones en el balance. La relevancia de este estudio acerca de los mecanismos bioquímicos que conducen a la recuperación después del daño cerebral es pertinente para el desarrollo de estrategias farmacológicas que mejoren la recuperación en humanos. Debe notarse que los resultados obtenidos en experiencias clínicas son muy similares a los observados en los animales experimentales,³⁴ sugiriendo que los mecanismos básicos de recuperación también son parecidos entre la rata y el humano.

Finalmente debe considerarse que el uso clínico de agonistas y antagonistas noradrenergicos en humanos con secuelas de daño cerebral, tales como antidepresivos y ansiolíticos, podrían acortar o alargar el tiempo en el que la depresión neuronal remota ocurre, facilitando o dificultando a la recuperación funcional. Más estudios son necesarios a fin de esclarecer los mecanismos detallados subyacentes a la recuperación cerebral después del daño. En particular el papel específico del LC en la depresión funcional noradrenérgica debe de ser estudiado.

REFERENCIAS.

1. Ackermann H., Mathiak K. y Riecker A. (2007) The contribution of the cerebellum to speech production and speech perception: clinical and functional imaging data. *Cerebellum*; 6: 202– 213.
2. Adametz J. (1959) Rate of recovery of functioning in cats with rostral reticular lesions; an experimental study. *J Neurosurg.* 16: 85-97.
3. Akkal D., Dum R. P. y Strick P. L. (2007) Supplementary motor area and presupplementary motor area: targets of basal ganglia and cerebellar output. *J. Neurosci.* 27: 10659- 10673.
4. Andres F. G. y Gerloff C. (1999) Coherence of sequential movements and motor learning. *J Clin Neurophysiol.* 16: 520–7.
5. Aroniadou V. A. y Keller A. (1995) Mechanisms of LTP induction in rat motor cortex in vitro. *Cereb Cortex*, 5: 353– 62.
6. Aroniadou V.A. y Teyler T.J. (1991) The role of NMDA receptors in long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) in rat visual cortex. *Brain Res.* 562: 136-143.
7. Artola A. y Singer W. (1989) NMDA receptors and developmental plasticity in visual neocortex. In G.L. Collingridge y J.C. Watkins (eds.), *The NMDA receptor*. Oxford University Press, Oxford: 153-166.
8. Aston-Jones G. y Cohen J. D. (2005) Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance. *J Comp Neurol.*: 493(1): 99-110.
9. Aston-Jones G., Raikowski J., Kubiak P. y Alexinsky T. (1994) Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. *J Neurosci.* 14: 4467- 4480.
10. Aston-Jones G., Rajkowski J., Cohen J. (2000) Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention, *Prog. Brain Res.* 126:165–182.
11. Bachman D.L. y Morgan A. (1988) The role of pharmacotherapy in the treatment of aphasia. *Aphasiology* 3/4: 225-228.
12. Baillieux H., De Smet H. J., Paquier P. F., De Deyn P. P y Mariën P. Cerebellar neurocognition: insights into the bottom of the brain. (2008) *Clin Neurol Neurosurg* 110(8): 763– 773.

13. Barbay S., Plautz E. J., Friel K. M., Frost S. B., Dancause N., Stowe A. M. y Nudo R. J. (2006) Behavioral and neurophysiological effects of delayed training following a small ischemic infarct in primary motor cortex of squirrel monkeys. *Exp Brain Res.* 169: 106-116.
14. Baron J., Bousser M., Comar D. y Castaigne P. (1980) Crossed cerebellar diaschisis in human supratentorial brain infarction. *Trans Am Neurol Assoc.* 105:459–61.
15. Bavelier D. y Neville H. J. (2002) Cross-modal plasticity: where and how? *Nat Rev Neuroscience*, 3: 443– 52.
16. Becaria A, Lahiri D.K., Bondy S.C., Chen D., Hamadeh A., Li H., Taylor R., Campbell A (2006) Aluminum and copper in drinking water enhance inflammatory or oxidative events specifically in the brain, *J. Neuroimmunol.* 176:16–23.
17. Berridge C.W. y Waterhouse W.D. (2003) The locus ceruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and satate-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res.* 42: 33- 84.
18. Biernaskie J., Chernenko G. y Corbett D. (2004) Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci.* 24: 1245- 1254.
19. Biernaskie J., Szymanska A., Windle V. y Corbett D. (2005) Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats. *Eur J Neurosci.* 21: 989- 999.
20. Bischoff-Grethe A., Goedert K. M., Willingham D. T. y cols. (2004) Neural substrates of response-based sequence learning using fMRI. *J Cogn Neurosci*, 16: 127– 38.
21. Bissette G. Effects of sertraline on regional neuropeptide concentrations in olfactory bulbectomized rats. (2001) *Pharmacol Biochem Behav.* 69: 1– 13.
22. Bliss T.V.P. y Dolphin A.C. (1985) What is the mechanism of long-term potentiation in the hippocampus? *T.I.N.S.* 5: 289-290.
23. Blitz D. M., Foster K. A. y Regehr D. G. (2004) Short-term synaptic plasticity: a comparison of two synapses. *Nat Rev Neurosci* , 5: 630– 40.
24. Bonvento G., Sibson N. y Pellerin L. (2002) Does glutamate image your thoughts? *Trends Neurosci*, 25: 359– 64.
25. Boroojerdi B., Phipps M., Kopylev L. y cols. (2001) Enhancing analogic reasoning with rTMS over the left prefrontal cortex. *Neurology*, 56: 526– 8.

26. Bowler J.V., Wade J.P.H., Jones B.E., Nijran K., Jewkes R.F., Cuming R. y Steiner T.J. (1995) Contribution of diaschisis to the clinical deficit in human cerebral infarction. *Stroke* 26: 1000-1006.
27. Boyden E.S., Katoh A. y Raymond J.L. (2004) Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Annu Rev Neurosci.* 27: 581–609.
28. Boyeson M.G. y Feeney D.M. (1990) Intraventricular norepinephrine facilitates motor recovery following sensorimotor cortex injury. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35: 497-501.
29. Boyeson M.G. y Harmon R.L. (1993) Effects of trazodone and desipramine on motor recovery in brain-injured rats. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 72: 286-293.
30. Boyeson M.G. y Krobert K.A. (1992) Cerebellar norepinephrine infusions facilitate recovery after sensorimotor cortex injury. *Brain Res Bull.* 18: 219- 227.
31. Boyeson M.G., Callister T.R. y Cavazos J.E. (1992a) Biochemical and behavioral effects of a sensorimotor cortex injury in rats pretreated with the noradrenergic neurotoxin DSP-4. *Behav. Neurosci.* 106: 964-973.
32. Boyeson M.G., Harmon R.L. y Jones J.L. (1994) Comparative effects of fluoxetine, amitriptyline and serotonin on functional motor recovery after sensorimotor cortex injury. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 73: 76-83.
33. Boyeson M.G., Krobert K.A., Grade C.M., y Scherer P.J. (1992b) Unilateral, but not bilateral, locus coeruleus lesions facilitate recovery from sensorimotor cortex injury. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43: 171-777.
34. Bragoni M., Altieri M., Di Piero V. y cols. (2000) Bromocriptine and speech therapy in non-fluent chronic aphasia after stroke. *Neurol Sci*, 21: 19– 22.
35. Brailowsky S. y Piña A.L. (1991) La plasticidad cerebral. La recuperación funcional después de lesiones cerebrales. *Ciencia* 42: 355-366.
36. Brailowsky S., Knight R.T. y Blood K. (1986a) γ -aminobutyric acid-induced potentiation of cortical hemiplegia. *Brain Res.* 362: 322-330.
37. Brailowsky S., Knight R.T. y Efron R. (1986b) Phenytoin increases the severity of cortical hemiplegia in rats. *Brain Res.* 376: 322-330.
38. Braunewell K. H., Manahan- Vaughan D. (2001) Long-term depression: a cellular basis for learning? *Rev Neurosci* . 12: 121– 40.

39. Buchel C., Coull J. T. y Friston K. J. (1999) The predictive value of changes in effective connectivity for human learning. *Science*. 283: 1538– 41.
40. Bucheller MM, Hadamek KK, Hein L (2002) Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 109:819–826.
41. Bueno-Nava, Montes, S., De la Garza- Montano, P. (2008) Reversal of noradrenergic depletion and lipid peroxidation in the pons after brain injury correlatos with motor function recovery in rats. *Neuroscience* 443: 32-6.
42. Bukowska D., Zguczynski L. y Mierzejewska- Krzyzowska B. (2003) Pontocerebellar projection to the rabbit paramedian lobule by means of axonal collaterals: evidence for intralobular connections. *Acta Neurobiol Exp*- 63: 295- 308.
43. Buonomano D. V. y Merzenich M. M. (1998) Cortical plasticity: from synapses to maps. *Ann Rev Neurosci*. 21:149–86.
44. Bury S. D. y Jones T. A. (2004) Facilitation of motor skill learning by callosal denervation or forced forelimb use in adult rats. *Behav Brain Res*. 150: 43- 53.
45. Butefisch C. M., Davis B. C., Wise S. P. y cols. (2000) Mechanisms of usedependent plasticity in the human motor cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 3661– 5.
46. Byrne J. H. *Synapses*. (1997) Plastic plasticity. *Nature*. 389: 791– 2.
47. Cao Y., D’Olhaberriague L, Vikingtand E.M. Levine S.R. y Welch K.M.A. (1998) Pilot study of fuctional MRI to assess cerebral activation of motor function after poststroke hemiparesis. *Stroke* 29: 112-122.
48. Carey J. R., Kimberley T. J., Lewis S. M., Auerbach E. J., Dorsey L., Rundquist P. y Ugurbil K. (2002) Analysis of fMRI and finger racking training in subjects with chronic stroke. *Brain*. 125: 773- 788.
49. Carmichael S. T. (2006) Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol*. 59: 735-742.
50. Carmichael S. T., Archibeque I., Luke L., Nolan T., Momiy J. y Li S. (2005) Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp Neurol*. 193: 291- 311.
51. Carpenter M. B. (1994) *Fundamentos de Neuroanatomía*. Editorial médica panamericana.

52. Chappell P.B., Smith M.A., Kilts C.D. y cols. (1986) . Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neurosci.* 6: 2908– 2914.
53. Chen P., Goldberg D. E., Kolb B., Lanser M. y Benowitz LI. (2002) Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 9031- 9036.
54. Chollet F., DiPiero V., Wise R.J.S., Brooks D.J., Dolan R.J. y Frackowiak R.S.J. (1991) The functional anatomy of motor recovery after stroke in humans: a study with positron emission tomography. *Ann. Neurol.* 29: 63-71.
55. Cicirata F, Zappalà A, Serapide MF, Parenti R, Pantò MR, Paz C. (2005) Different pontine projections to the two sides of the cerebellum. *Brain Res.* 49: 280-94.
56. Ciranna L. (2006) Serotonin as a modulator of glutamate and GABA mediated neurotransmission: implication physiological functions and in pathology. *Curr Neurpharmacol* 4: 101- 114.
57. Clower D. M., Dum R. P. y Strick P. L. (2005) Basal ganglia and cerebelar inputs to AIP. *Cereb. Cortex* . 15: 913- 920.
58. Cohen B.M. y Lipinski J.F. (1986) In vivo potencies of antipsychotic drugs in blocking alpha 1 noradrenergic and dopamine D2 receptors: implications for drug mechanisms of action. *Life Sci.* 39: 2571-2580.
59. Corbett D. (1980) Long term potentiation of lateral hypothalamic self-stimulation following parabrachial lesions in the rat. *Brain Res. Bull.* 5: 637-642.
60. Cotman C. W. y Berchtold N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 2002; 25: 295– 301.
61. Cramer S. C. y Crafton K. R. (2006) Somatotopy and movement representation sites following cortical stroke. *Exp Brain Res.* 168: 25- 32.
62. Cramer S. C., Shah R., Juranek J., Crafton K. R. y Le V. (2006) Activity in the peri-infarct rim in relation to recovery from stroke. *Stroke* 37: 111- 115.
63. Crisostomo E.A., Duncan P.W., Propst M.A., Dawson D.B. y Davis J.N. (1988) Evidence that amphetamine with physical therapy promotes recovery of motor function in stroke patients. *Ann. Neurol.* 23: 94-97.

64. Crow T.J. (1968) Cortical synapses and reinforcement: a hypothesis. *Nature* 219: 736-737.
65. Cucchiaro G., Chaijale N. y Commons K. (2006) The locus coeruleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the nicotinic receptor agonist, epibatidine. *Neuropharmacology* 50: 769- 776.
66. Culic M., Blanusa L.M., Grbic G., Spacis S., Jankovic B. y Kalauizi A. (2005) Spectral analysis of cerebellar activity after acute brain injury in anesthetized rats. *Acta Neurobiol Exp* 65: 11- 17.
67. Custodio-Ramírez V. y González-Piña R. (1992) Caracterización conductual y anatómica de la recuperación funcional pasiva y la inducida por transplantes de tejido neural embrionario en ratas con hemiplejía experimental mantenidas en ambiente enriquecido. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM., México.
68. D'Ambrosio R., Perucca E. (2004) Epilepsy after brain injury. *Curr Opin Neurol* 17: 731-735.
69. Dahl D. y Sarvey J.M. (1989) Norepinephrine induces pathway-specific long-lasting potentiations and depression in the hippocampal dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4776-4780.
70. Dahl D. y Sarvey J.M. (1990) Beta-Adrenergic agonist induced long-lasting synaptic modifications in hippocampal dentate gyrus require activation of NMDA receptors, but not electrical activation of afferents. *Brain Res.* 526: 347-350.
71. Dam M., Tonin P., De Boni A., Pizzolato G., Casson S., Ermani M., Freo U., Piron L. y Battistin L. (1996) Effects of fluoxetine and maprotiline on functional recovery in poststroke hemiplegic patients undergoing rehabilitation therapy. *Stroke* 27: 1211-1214.
72. Davies K.J. (1995) Oxidative stress the parodox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61: 1-31.
73. Davis J.N., Arnett C.D., Hoyler E., Stalvey L.P. Daly J.W. y Skolnick P. (1978) Brain alpha-adrenergic receptors: comparison of [3H] WB4101 binding with norepinephrine-stimulated cyclic AMP accumulation in rat cerebral cortex. *Brain Res.* 159: 125-135.
74. Debaere F., Wenderoth N., Sunaert S., VanHecke P. y Swinnen S.P. (2004) Changes in brain activation during the acquisition of a new bimanual coordination task. *Neuropsychologia* 42: 855–867.

75. Desmurget M., Grafton S. T., Vindras P., y cols.. (2003) Basal ganglia network mediates the control of movement amplitude. *Exp Brain Res* 153: 197– 209.
76. Desmurget M, Bonnetblanc FC, Duffau H. (2007) Contrasting acute and slow-growing lesions: a new door to brain plasticity. *Brain*. 130: 898-914.
77. Diamond M. C., Rosenzweig M. R., Bennett E. L., Lindner B. y Lyon L. (1972) Effects of environmental enrichment and impoverishment on rat cerebral cortex. *J Neurobiol* 3: 47-64.
78. Dietrich W.D., Alonso O., Busto R. y Ginsberg M.D. (1990) Influence of amphetamine treatment on somatosensory function of the normal and infarcted rat brain. *Stroke (Suppl. III)* 21: 147-150.
79. Duffau H. (2005) New insights into functional mapping in cerebral tumor surgery: study of the dynamic interactions between the lesion and the brain. In: Columbus F, editor. *Brain Mapping: New Research*. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers.
80. Duffau H., Denvil D. y Capelle L. (2002) Long term reshaping of language, sensory, and motor maps after glioma resection: a new parameter to integrate in the surgical strategy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72: 511– 6.
81. Duman R. (2002) Synaptic plasticity and mood disorders. *Mol Psychiatry* 7: 129- 13.
82. Escalante-Membrillo C. y Márquez-Rangel R. (1992) Recuperación funcional en ratas con hemiplejía experimental. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
83. Escalante-Membrillo C., Gonzalez-Maciel A., Reynoso-Robles R., Gonzalez-Pina R (2005) Brain thiobarbituric acid-reactive substances in rats after short periods of ozone exposure, *Environ. Res.* 99:68–71.
84. Evers S., Bockermann I. y Nyhuis P. W. (2001) The impact of transcranial magnetic stimulation on cognitive processing: an event-related potential study. *NeuroReport*. 12: 2915– 8.
85. Feeney D. M. y Baron J. C. (1986) Diaschisis. *Stroke*- 17: 817– 30.

86. Feeney D. M. y Hovda D. A. (1985) Reinstatement of binocular depth perception by amphetamine and visual experience after visual cortex ablation. *Brain Res.* 342(2): 352-356.
87. Feeney D. M., Gonzalez A. y Law W. A. (1982) Amphetamine, haloperidol and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science.* 217 (4562):855-857.
88. Feeney D.M. (1991) Pharmacologic modulation of recovery after brain injury: a reconsideration of diaschisis. *J. Neuro. Rehab.* 5:113-128.
89. Feeney D.M. y Sutton R.L. (1987) Pharmacotherapy for recovery of function after brain injury. *CRC Crit. Rev. Neurobiol.* 3: 135-197.
90. Feeney D.M. y Westerberg V.S. (1990) Norepinephrine and brain damage: alpha noradrenergic pharmacology alters functional recovery after cortical trauma. *Can. J. Psychol.* 44: 233-252.
91. Feeney D.M., Sutton R.L., Boyeson M.G. y cols. (1985) The locus coeruleus and cerebral metabolism: recovery of function after cortical injury. *Physiol Psychol* 13: 197-203.
92. Festing MFW (1994) Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab. Anim. Sci.* 28:212-221
93. Fields R. D. y Stevens-Graham B. (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298: 556– 62.
94. Finger S, Marshak RA, Cohen M, Scheff S, Trace R, Niemand D. (1971) Effects of successive and simultaneous lesions of somatosensory cortex on tactile discrimination in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 77: 221-7.
95. Finney E, Fine I, Dobkins K. (2001) Visual stimuli activate auditory cortex in the deaf. *Nat Neurosci* 4:1171–3.
96. Fiorelli M., Blin J., Bakchine S., Laplane D. y Baron J.C. (1991) PET studies of cortical diaschisis in patients with motor hemi-neglect. *J. Neurol. Sci.* 104: 135-142.
97. Fischer T. M., Blazis D. E. y Priver N. A., y cols. (1997) Metaplasticity at identified inhibitory synapses in aplysia. *Nature.* 389: 860– 5.
98. Foeller E. y Feldman D. E. (2004) Synaptic basis for developmental plasticity in somatosensory cortex. *Curr Opin Neurobiol.* 14: 89– 95.

99. Foote S., Bloom F. y Aston-Jones G. (1983) Nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev.* 63: 164- 171.
100. Frazzini V., Rockabrand E., Mocchegiani E., Sensi S.L. (2006) Oxidative stress and brain aging: is zinc the link? *Biogerontology* 7:307–314.
101. Frost S. B., Barbay S., Friel K. M., Plautz E. J. y Nudo R. J. (2003) Reorganization of remote cortical regions after ischemic brain injury: a potential substrate for stroke recovery. *J Neurophysiol.* 89: 3205- 3214.
102. Fuxe K. y Ungerstedt U. (1970) Histochemical, biochemical and functional studies on central monoamine neurons after acute and chronic amphetamine administration. In E. Costa, S. Garattini (eds.), *Amphetamines and related compounds*. Raven Press, New York, 257-288.
103. Gandolfo F., Li C., Benda B. J., y cols. (2000) Cortical correlates of learning in monkeys adapting to a new dynamical environment. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 2259– 63.
104. Ganis G., Keenan J. P., Kosslyn S. M., y cols. (2000) Transcranial magnetic stimulation of primary motor cortex affects mental rotation. *Cereb Cortex* 10: 175– 80.
105. Gesi M., Soldani P., Giorgi F. S., Santinami A., Bonaccorsi I. y Fornai F. (2000) The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease. *Neurosc Biobehav Rev.* 24: 655- 668.
106. Gharbawie O. A., Gonzalez C. L., Williams P. T., Kleim J. A. y Whishaw I. Q. (2005) Middle cerebral artery (MCA) stroke produces dysfunction in adjacent motor cortex as detected by intracortical microstimulation in rats. *Neuroscience.* 130: 601- 610.
107. Gibbs M. E. y Summers R. J. (2000) Separate roles for β_2 and β_3 - adrenoceptors in memory consolidation. *Neuroscience* 95: 913– 922.
108. Gibbs M. E. y Summers R. J. (2005) Contrasting roles for β_1 , β_2 and β_3 - Adrenoceptors in memory formation in the chick. *Neuroscience* 131: 31– 42.
109. Glassman R.B. y Smith A. (1988) Neural spare capacity and the concept of diaschisis. Functional and evolutionary models. In: Finger S., Levere T.E., Almlí C.R. y Stein D.G. ed. *Brain injury and recovery. Theoretical and controversial issues*. Plenum. Press. New York and London: 45-69.

110. Glees P. y Cole J. (1950) Recovery of skilled motor functions after small repeated lesions of motor cortex in macaque. *J Neurophysiol.*13: 137- 148.
111. Gold L. y Lauritzen M. (2002) Neuronal deactivation explains decreased cerebellar blood flow in response to focal cerebral ischemia or suppressed neocortical function. *Proc Natl Acad Sci* 99: 7699– 704.
112. Goldstein L. B. (2006) Neurotransmitters and motor activity: effects on functional recovery after brain injury. *NeuroRx* 3: 451- 457.
113. Goldstein L.B. (1990) Pharmacology of recovery after stroke. *Stroke (Suppl III)* 21: 139-142III.
114. Goldstein L.B. (1995) Sygen in Acute Stroke Study Investigators, Common drugs may influence motor recovery after stroke. *Neurology* 45: 865-871.
115. Goldstein L.B. (1996) Pharmacologic interventions for improving functional tasks and altering brain behavior. In J. Toole, D. Good (eds.), *Imaging in neurorehabilitation*. Demos Vermande: 155-169.
116. Goldstein L.B. (1997a) Effects of bilateral and unilateral locus coeruleus lesions on beam-walking recovery after subsequent unilateral sensorimotor cortex suction-ablation in the rat. *Restor. Neurol. Neurosci.* 11: 55-63.
117. Goldstein L.B. (2000) Effects of amphetamines and small related molecules on recovery after stroke in animals and man. *Neuropharmacology* 39: 852- 859.
118. Goldstein L.B. y Bullman S. (1997) Effects of dorsal noradrenergic bundle lesions on recovery after sensorimotor cortex injury. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58: 1151-1157.
119. Goldstein L.B. y Davis J.N. (1988) Physician prescribing patterns following hospital admission for ischemic cerebrovascular disease. *Neurology* 38: 1806-1809.
120. Goldstein L.B. y Davis J.N. (1990a) Clonidine impairs recovery of beam-walking in rats. *Brain Res.* 508: 305-309.
121. Goldstein L.B. y Davis J.N. (1990b) Post-lesion practice and amphetamine-facilitated recovery of beam-walking in the rat. *Restor. Neurol. Neurosci.* 1: 311-314.
122. Goldstein L.B., Matchar D.B., Morgenlander J.C. y Davis J.N. (1990) Influence of drugs on recovery of sensorimotor function after stroke. *J. Neuro. Rehab.* 4: 137-144.

123. Goldstein L.B., Poe H.V. y Davis J.N. (1989) An animal model of recovery of function after stroke: Facilitation of recovery by an α_2 -adrenergic receptor antagonist. *Ann. Neurol.* 26: 157.
124. Goldstein LB. (1999) Amphetamine-facilitated functional recovery after stroke. In: Ginsberg MD, Dietrich WD (eds.). *Cerebrovascular Diseases: Sixteenth Research (Princeton) Conference*. New York, NY: Raven Press; p. 303-8.
125. Goldstein LB. (2003) Neuropharmacology of TBI-induced plasticity. *Brain Injury.* 17: 685-94.
126. Golla H., Their P. y Haarmeier T. (2005) Disturbed overt but normal covert shifts of attention in adult cerebellar patients. *Brain.* 128: 1525– 1535.
127. Gonzalez-Piña R., Bueno-Nava A., Escalante-Membrillo C., Montes S., Gonzalez-Maciel A., Ayala-Guerrero F. (2003) Cerebellar and pontine norepinephrine contents after motor recovery in rats, *Res. Neurol. Neurosci.* 21:219–220.
128. González-Piña R., Bueno-Nava A., Montes S., Alfaro-Rodríguez A., González-Maciel A., Reynoso-Robles R., Ayala-Guerrero F. (2006) Pontine and cerebellar Norepinephrine Content in Adults in Rats Recovering from Focal Cortical Injury. *Neurochem. Res.* 31: 1443-9.
129. Gonzalez-Piña R., Bueno-Nava A., Montes S. y cols. (2005) Pontine norepinephrine content after motor cortical ablation in rats. *Proc West Pharmacol Soc* 48:73–76.
130. González-Piña R., Bueno-Nava A, Alfaro-Rodríguez A., Durand-Rivera A. (2008) Caracterización de la conducta motora en ratas con ablación cortical. *Rev. Neurol.* 47(6):304-309.
131. Gonzalez-Piña R., Paz C. (1997) Brain monoamine changes in rats after short periods of ozone exposure. *Neurochem Res* 22:63–66
132. Gotman I (1997) Characteristics of metals used in implants. *J Endourol* 11:383–389 52.
133. Gould E. y Gross C. G. (2002) Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 22: 619– 23.
134. Grade C., Redford B., Chrostowski J., Toussaint L. y Blackwell B. (1998) Methylphenidate in early poststroke recovery: a double-blind, placebo-controlled study. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 79: 1047-1050.

135. Grafman J. y Wassermann E. (1999) Transcranial magnetic stimulation can measure and modulate learning and memory. *Neuropsychologia* 37: 159– 67.
136. GrandPre T., Nakamura F., Vartanian T., y cols. (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature*. 403: 439– 44.
137. Gross C. G. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1: 67– 73.
138. Grudzien A, Shaw P, Weintraub S, Bigio E, Mash DC, Mesulam MM. (2006) Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* (En prensa).
139. Gupta S.R., Mlcoch A.G., Scolaro C. y Moritz, T. (1995) Bromocriptine treatment of nonfluent aphasia. *Neurology* 45: 2170-2173.
140. Hall R.D., Lindholm E.P. (1974) Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Res* 66:23–38.
141. Halliwell B., Gutteridge J.M. (1997) Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals, *J. Neurochem.* 69:1330–1331.
142. Halliwell B., Gutteridge J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.* 219:1–14.
143. Hari R. y Salmelin R. (1997) Human cortical oscillations: a neuromagnetic view through the skull. *Trends Neurosci* 20: 44– 9.
144. Hatten M. E. (2002) New directions in neuronal migration. *Science*. 297: 1660– 3.
145. Haydon P. G. (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2: 185– 93.
146. Hedden T. y Gabrieli J. D. E. (2004) Insights into ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 5: 87– 96.
147. Hernandez T.D. y Holling L.C. (1994) Disruption of behavioral recovery by the anti-convulsant phenobarbital. *Brain Res.* 635: 300-306.
148. Hertz-Pannier L. (1999) Brain plasticity during development: physiological bases and functional MRI approach. *J Neuroradiol.* 26: S66– 74.
149. Hironishi M., Ueyama E., Senba E. (1999) Systematic expression of immediate early genes and intensive astrocyte activation induced by intrastriatal ferrous iron injection. *Brain Res.* 828:145–153

150. Hlustik P., Solodkin A., Gullapalli R. P., y cols. (2001) Somatotopy in human primary motor and somatosensory hand representations revisited. *Cereb Cortex* 11: 312– 21.
151. Hlustik P., Solodkin A., Gullapalli R., y cols. (2000) Hand motor skill learning generalizes anatomically and behaviorally. *NeuroImage* 11: S866.
152. Hobson J. A., McCarley R. W. y Wyzinski P. W. (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189: 55– 58.
153. Hobson J.A., McCarley R.W. (1977) The brain as a dream state generator: an activation synthesis hypothesis of the dream process. *Am J Psychiatry*. 134: 1335- 48.
154. Holmes G. L. y McCabe B. (2001) Brain development and generation of brain pathologies. *Int Rev Neurobiol*. 45: 17– 41.
155. Hoover J. E. y Strick P. L. (1999) The organization of cerebellar and basal ganglia outputs to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of herpes simplex virus type 1. *J. Neurosci*. 19: 1446- 1463.
156. Horner P. J. y Palmer T. D. (2003) New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. *La vida loca! Trends Neurosci*. 26: 597– 603.
157. Hovda D.A. y Feeney D.M. (1984) Amphetamine with experience promotes recovery of locomotor function after unilateral frontal cortex injury in the cat. *Brain Res*. 298: 358- 361.
158. Hovda D.A., Bailey B., Montoya S., Salo A.A. y Feeney D.M. (1983) Phentermine accelerates recovery of function after motor cortex injury in rats and cats. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol*. 42: 1157.83.
159. Hovda D.A., Sutton R.L. y Feeney D.M. (1989) Amphetamine-induced recovery of visual cliff performance after bilateral visual cortex ablation in cats: Measurements of depth perception thresholds. *Behav. Neurosci*. 103: 574-584.
160. Hsu J. E. y Jones T. A. (2005) Time-sensitive enhancement of motor learning with the less-affected forelimb after unilateral sensorimotor cortex lesions in rats. *Eur J Neurosci*. 22:2069-2080.
161. Hsu J. E. y Jones T. A. (2006) Contralesional neural plasticity and functional changes in the less-affected forelimb after large and small cortical infarcts in rats. *Exp Neurol*. 201: 471- 494.

162. Hubel D. H. y Wiesel T. N.. (1965) Binocular interaction in striate cortex in kittens raised with artificial squint. *J Neurophysiol* 28: 1041– 59.
163. Humm J. L., Kozlowski D. A., Bland S. T., James D. C. y Schallert T. (1999) Use-dependent exaggeration of brain injury: is glutamate involved? *Exp Neurol*. 157: 349-358.
164. Hurwitz B.E., Dietrich W.D., McCabe P.M., Watson B.D., Ginsberg M.D. y Sneiderman N. (1989) Amphetamine-accelerated recovery from cortical barrel-field infarction: Pharmacological treatment of stroke. In M.D. Ginsberg, W.D. Dietrich (eds.), *Cerebrovascular diseases. The Sixteenth Research (Princeton) Conference*. Raven Press: 309-318.
165. Infeld B., Davis S.M., Lichtenstein M., Mitchell P.J. y Hopper J.L. (1995) Crossed cerebellar diaschisis and brain recovery after stroke. *Stroke* 26: 90-95.
166. Innes I.R. y Nickerson M. (1985) Norepinephrine, epinephrine, and the sympathomimetic amines. In L.S. Goodman, A.G. Gilman, A. Gilman, G.B. Koelle (eds.), *The pharmacological basis of therapeutics*. Macmillan Publishing Company: 477-513.
167. Ishida Y., Shirokawa T., Komatsu Y. y Isobe K. (2001b) Changes in cortical noradrenergic axon terminals of locus coeruleus neurons in aged F344 rats. *Neurosci Lett*. 307: 197– 199.
168. Ishida Y., Shirokawa T., Miyaishi O., Komatsu Y. y Isobe K. (2001a) Age dependent changes in noradrenergic innervations of the frontal cortex in F344 rats. *Neurobiol Aging* 22: 283– 286.
169. Ito M. (2004) *The Cerebellum and Neural Control*. Raven, NewYork.
170. Ivanko T. L. y Greenough W. T. (2000) Physiological consequences of morphologically detectable synaptic plasticity: potential uses for examining recovery following damage. *Neuropharmacology*. 39: 765– 76.
171. Jacobs K. M. y Donoghue J. P. (1991) Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science* 251: 944– 7.
172. Jaillard A., Martin C. D., Garambois K., Lebas J. F. y Hommel M. (2005) Vicarious function within the human primary motor cortex? A longitudinal fMRI stroke study. *Brain*. 128: 1122- 1138.

173. Jenkins I. H., Brooks D. J., Nixon P. D., y cols. (1994) Motor sequence learning: a study with positron emission tomography. *J Neurosci.* 14: 3775– 90.
174. Jenkins W. M y Merzenich M. (1987) Reorganization of neocortical representations after brain injury: a neurophysiological model of the bases of recovery from stroke. *Prog Brain Res.* 71: 249– 66.
175. Johansson B. B. (2003) Environmental influence on recovery after brain lesions – experimental and clinical data. *J Rehabil Med.* 41 (Suppl): 11–6.
176. Johansson B. B., Zhao L. y Mattsson B. (1999) Environmental influence on gene expression and recovery from cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 73: 51– 5.
177. Johnson M.L., Roberts M.D., Ross A.R. y Witten C.M. (1992) Methylphenidate in stroke patients with depression. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 71: 239-241.
178. Johnson M.T. y Ebner T.J. (2000) Processing of multiple kinematic signals in the cerebellum and motor cortices. *Brain Res Rev.* 33: 155- 168.
179. Jones B. E. (2003) Arousal systems. *Front Biosci.* 8: 438- 451.
180. Jones T. A. y Schallert T. (1994) Use-dependent growth of piramidal neurons after neocortical damage. *J Neurosci.* 14: 2140- 2152.
181. Kala S.V., Hasinoff B.B., Richardson J.S. (1996) Brain samples from Alzheimer's patients have elevated levels of loosely bound iron. *Int J Neurosci* 86:263–269
182. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. (2000) *Principles of neural science.* McGraw-Hill, New York
183. Karni A., Meyer G., Rey-Hipolito C., y cols. (1998) The acquisition of skilled motor performance: fast and slow experience-driven changes in primary motor cortex. *Proc Natl Acad Sci.* 95: 861– 8.
184. Kasamatsu T., Pettigrew J.D. y Ary M. (1979) Restoration of visual cortical plasticity by local microperfusion of norepinephrine. *J. Comp. Neurol.* 185: 163-182.
185. Kawahara H., Kawahara Y. y Westerink B.H. (2000) The role of afferents to the locus coeruleus in the handling stress- induced increase in the release of noradrenaline in the medial prefrontal cortex: a dual- probe microdialysis study in the rat brain. *Eur J of Pharmacol.* 387: 279- 286.
186. Kawato M. (1999) Internal models for motor control and trajectory planning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 718- 727.

187. Keller A., Iriki A. y Asanima H. (1990) Identification of neurons producing long-term potentiation in the cat motor cortex: intracellular recordings and labeling. *J. Comp. Neurol.* 300: 47-60.
188. Kelly R. M. y Strick P. L. (2003) Cerebellar loops with motor cortex and prefrontal cortex of a nonhuman primate. *J. Neurosci.* 23: 8432- 8444.
189. Kikuchi K, Nishino K Ohyu H. (2000) Increasing CNS norepinephrine levels by the precursor L-DOPS facilitates beam-walking recovery after sensorimotor cortex ablation in rats. *Brain Res.* 860: 130-5.
190. Kishki R., Bongiovanni R., Rubens de Nadai T., y cols. (2006) Dorsal raphe nucleus and locus coeruleus neural networks and the elaboration of the sweet-substance-induced antinociception. *Neurosci Lett.* 395: 12- 17.
191. Kline A.E., Chen M.J. y Tso-Olivas D.Y., Feeney D.M. (1994) Methylphenidate treatment following ablation-induced hemiplegia in rat: Experience during drug action alters effects on recovery of function. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48: 773-779.
192. Kobayashi M. y Pascual-Leone. (2003) Transcranial magnetic stimulation in neurology. *Lancet Neurol* 2: 145– 56.
193. Kossut M. y Siucinska E. (1998) Learning-induced expansion of cortical maps-what happens to adjacent cortical representations? *NeuroReport.*9: 4025– 8.
194. Kozlowski D. A., James D. C. y Schallert T. (1996) Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. *J Neurosci.* 16: 4776- 4786.
195. Krings T., Topper R., Foltys H., y cols. (2000) Cortical activation patterns during complex motor tasks in piano players and control subjects. A functional magnetic resonance imaging study. *Neurosci Lett.* 278: 189– 93.
196. Krobert K.A., Sutton R.L. y Feeney D.M. (1994) Spontaneous and amphetamine-evoked release of cerebellar noradrenaline after sensorimotor cortex contusion: an *in vivo* microdialysis study in the awake rat. *J Neurochem.* 62: 2233- 2240.
197. Kujala T., Alho K. y Naatanen R. (2000) Cross-modal reorganization of human cortical functions. *Trends Neurosci* 23: 115– 20.
198. Langle S. L., Poulain D. A. y Theodosis D. T. (2002) Neuronal-glia remodeling: a structural basis for neuronal-glia interactions in the adult hypothalamus. *J Physiol.* 96: 169– 75.

199. Larsson M., Ervik M., Lundborg P., Sundh V. y Svanborg A. (1988) Comparison between methylphenidate and placebo as adjuvant in care and rehabilitation of geriatric patients. *Comp. Gerontol.* 2: 53-59.
200. Laubach M., Wessberg J. y Nicolelis M. A. (2000) Cortical ensemble activity increasingly predicts behaviour outcomes during learning of a motor task. *Nature* 405: 567– 71.
201. Lazarus L.W., Moberg P.J., Langsley P.R. y Lingam V.R. (1994) Methylphenidate and nortriptyline in treatment of poststroke depression: a retrospective comparison. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 75: 403-406.
202. Leergaard T.B. (2003) Clustered and laminar topographic patterns in rat cerebro-pontine pathways. *Anat Embryol (Berl)* 206:149– 162 25.
203. Levin B.E., Brown K.L., Pawar G., Dunn-Meynell A. (1995) Widespread and lateralization effects of acute traumatic brain injury on norepinephrine turnover in the rat brain, *Brain Res.* 674:307–313.
204. Li S. y Carmichael S. T. (2006) Growth-associated gene and protein expression in the region of axonal sprouting in the aged brain after stroke. *Neurobiol Dis.* 23: 362-373.
205. Liepert J., Miltner W. H., Bauder H., Sommer M., Dettmers C., Taub E. y Weiller C. (1998) Motor cortex plasticity during constraint-induced movement therapy in stroke patients. *Neurosci Lett.* 250: 5- 8.
206. Lipsey J.R., Pearlson G.D., Robinson R.G., Rao K. y Price T.R. (1984) Nortriptyline treatment of post-stroke depression: a double-blind study. *Lancet* 1: 297-300.
207. Luke L. M., Allred R. P. y Jones T. A. (2004) Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage induces contralesional synaptogenesis and enhances skilled reaching with the ipsilateral forelimb in adult male rats. *Synapse.*54: 187- 199.
208. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405: 951– 5.
209. Maharaj D.S., Limson J.L., Daya S. (2003) 6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation, *Life Sci.* 72:1367–1375.

210. Majumdar S. y Mallick B. N. (2003) Increased levels of tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in locus coeruleus neurons after rapid eye movement sleep deprivation in rats. *Neuroscience Letters* 338: 193– 196.
211. Malenka R. C. y Nicoll R. A. (1997) Silent synapses speak up. *Neuron* 19: 473– 6.
212. Manto M. y Marmolino D. (2009) Cerebellar disorders- at the crossroad of molecular pathways and diagnosis. *Cerebellum* 8: 417- 422.
213. Martin S. J., Grimwood P. D. y Morris R. G. (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 23: 649– 711.
214. Mathew R.J. y Wilson W.H. (1985) Dextroamphetamine-induced changes in regional cerebral blood flow. *Psychopharmacology* 87: 298-302.
215. Medina J. F., Nores W. L. y Mauk M. D. (2002) Inhibition of climbing fibrosis a signal for the extinction of conditioned eyelid responses. *Nature* 416 (6878): 330–333.
216. Merzenich M. M. y Jenkins W. M. (1993) Reorganization of cortical representations of the hand following alterations of skin inputs induced by nerve injury, skin island transfers, and experience. *J Hand Ther* 6: 89– 104.
217. Mewasingh L., Christiaens F., Aeby A., Christophe C. y Dan B. (2002) Crossed cerebellar diaschisis secondary to refractory frontal seizures in childhood. *Seizure* 11: 489– 93.
218. Meyer B.-U., Rörich S. y Woiciechowsky C. (1998) Topography of fibers in the human corpus callosum mediating interhemispheric inhibition between the motor cortices. *Ann. Neurol.* 43: 360-369.
219. Meyer J., Obara K. y Muramatsu K. (1993) Diaschisis *Neurol Res* 15: 362– 6.
220. Miall R.C. y Jenkinson E.W. (2005) Functional imaging of changes in cerebellar activity related to learning during a novel eye–hand tracking task. *Exp Brain Res* 166: 170–183.
221. Middleton F. A. y Strick P. L. (1994) Anatomical evidence for cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function. *Science* 266: 458- 461.
222. Middleton F. A. y Strick P. L. (2001) Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate. *J. Neurosci.*, 21: 700- 712.

223. Mitchell J. C., Li X. F., Thalabard J. C. y O'Byrne K. T. (2005) The role of the locus coeruleus in corticotropin-releasing hormone and stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat. *Endocrinology* 146: 323- 331.
224. Mokha S., McMillan J. y Iggo A. (1986) Pathways mediating descending control of spinal nociceptive transmission from the nuclei locus coeruleus (LC) and Raphe magnus (NRM) in the cat. *Exp Brain Res.* 61: 597- 606.
225. Molinari M., Leggio M. G., Solida A., y cols. (1997) Cerebellum and procedural learning: evidence from focal cerebellar lesions. *Brain* 120: 1753– 62.
226. Mosley R.I. Benner E.J., Kadiu I y cols. (2006) Neuroinflammation oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin. Neurosci.* 6: 261- 281.
227. Motaghi S., Sheibani V., Farazifard R. y Joneidi H. (2006) Electrical stimulation of locus coeruleus strengthens the surround inhibition in layer V barrel cortex in rat. *Neurosc Lett* 401: 280- 284.
228. Mottaghy F. M., Hungs M., Brugmann M., y cols. (1999) Facilitation of picture naming after repetitive transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 53: 1806– 12.
229. Munte T. F., Altenmuller E. y Jancke L. (2002) The musician's brain as a model of neuroplasticity. *Nat Rev Neurosci* 3: 473– 8.
230. Nagai T., Satoh K., Imamoto K. y Maeda T. (1981) Divergent projections of catecholamine neurons of the locus coeruleus as revealed by fluorescent retrograde double labeling technique. *Neurosc. Lett.* 23: 117-123.
231. Nakai S., Matsunaga W., Ishida Y., Isobe K. y Shirokawa T. (2006) Effects of BDNF infusion on the axon terminal of locus coeruleus of aging rats. *Neurosci Res* 54: 213-219.
232. Napieralski J. A., Butler A. K. y Chesselet M. F. (1996) Anatomical and functional evidence for lesion-specific sprouting of corticostriatal input in the adult rat. *J Comp Neurol.* 373: 484- 497.
233. Nasser A. Minneman K.P. (1987) Relationship between alpha 2.adrenergic receptor binding sites and the functional receptors inhibiting norepinephrine release in rat cerebral cortex. *Mol. Pharmacol.* 32:655-662.
234. Netz H., Lammers T. y Hömberg V. (1997) Reorganization of motor output in the non-affected hemisphere after stroke. *Brain* 120: 1579-1586.

235. Neumann-Haefelin T. y Witte O. W. (2000) Periinfarct and remote excitability changes after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20: 45- 52.
236. Ng S. C., de la Monte S. M., Conboy G. L., Karns L. R. y Fishman M. C. (1988) Cloning of human GAP-43: growth association and ischemic resurgence. *Neuron.* 1: 133- 139.
237. Nguyen D. K. y Botez M. I. (1998) Diaschisis and neurobehavior. *Can J Neurol Sci* 25: 5– 12.
238. Niimura K., Chugani D.C., Muzik O. y cols, (1999) Cerebellar reorganization following cortical injury in humans: effects of lesion size and age. *Neurology* 52:792–797.
239. Nudo R. J, Milliken G. W. y Jenkins W. M., y cols. (1996a) Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J Neurosci*; 16: 785– 807.
240. Nudo R. J. y Milliken G. W. (1996) Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys. *J Neurophysiol.* 75: 2144- 2149.
241. Nudo R. J., Wise B. M., SiFuentes F. y Milliken G. W. (1996) Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science.* 272: 1791- 1794.
242. Nudo RJ, Plautz EJ, Frost SB. (2001) Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle &Nerve.* 24, 8: 1000-19.
243. Nunes M. C., Roy N. S., Keyoung H. M., y cols. (2003) Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med.* 9: 439– 47.
244. Obata T. (2002) Role of hydroxyl radical formation in neurotoxicity as revealed by in vivo free radical trapping, *Toxicol. Lett.* 132 (2002) 83–93.
245. Olanow C.W. y Tatton W. G. (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* 22: 123- 144.
246. Olfert E.D., Cross B.M., McWilliam A.A. (1993) Guide to the care and use of experimental animals. *Can Council Anim Care.*

247. Olpe H.R. y Karlsson G. (1990) The effects of baclofen and tow GABA B-receptor antagonists on long-term potentiation. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 342: 194-197.
248. Pantano P., Formisano R., Ricci M., Barbanti P., Fiorelli M., Sabatini U., DiPiero V. y Lenzi G.L. (1993) Prolonged muscular flaccidity in stroke patients is associated with crossed cerebellar diaschisis. *Cerebrovasc. Dis.* 3: 80-85.
249. Pascual-Leone A., Grafman J. y Hallett M. (1994) Modulation of cortical motor output maps during development of implicit and explicit knowledge. *Science* 263: 1287– 9.
250. Passerin A.M., Cano G., Rabin B.S., Delano B.A., Napier J.L. y Sved A.F. (2000) Role of locus coeruleus in foot shock- evoked Fos expression in rat brain. *Neuroscience* 101: 1071- 1082.
251. Patronas N., Di Chiro G., Smith B., y cols. (1984) Depressed cerebellar glucose metabolism in supratentorial tumors. *Brain Res.* 291 (1): 93– 101.
252. Paus T. (2001) Primate anterior cingulate cortex: where motor control, drive and cognition interface. *Nat Rev Neurosci.* 2: 417– 24.
253. Payne R. y Lomber S. (2001) Reconstructing functional systems after lesions of cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2: 911– 9.
254. Pesenti M., Thioux M., Seron X., y cols. (2000) Neuroanatomical substrates of arabic number processing, numerical comparison, and simple addition: a PET study. *J Cogn Neurosci* 12: 461– 79.
255. Picard N. y Strick P. L. (2001) Imaging the premotor areas. *Curr Opin Neurobiol* 11: 663– 72.
256. Pincus D. W., Harrison-Restelli C., Barry J., y cols. (1997) In vitro neurogenesis by adult human epileptic temporal neocortex. *Clin Neurosurg* 44: 17– 25.
257. Pinos H., Collado P., Salas M. y Pérez-Torrero E. (2004) Undernutrition and food rehabilitation effects on the locus coeruleus in the rat. *Neuro Report* 15: 1417- 1420.
258. Prablanc C., Desmurget M. y Grea H. (2003) Neural control of on-line guidance of hand reaching movements. *Prog Brain Res* 142: 155– 70.
259. Prasad R.M., Dhillon H.S., Carbary T. y Kraemer P.J. (1995) Amphetamine affects the behavioral outcome of lateral fluid percussion brain injury in the rat. *Restor. Neurol. Neurosci.* 9: 65-75.

260. Rafalowska U., Liu G.J., Floyd R.A. (1989) Peroxidation induced changes in synaptosomal transport of dopamine and gamma-aminobutyric acid, *Free Radic. Biol. Med.* 6:485–492.
261. Redecker C., Luhmann H. J., Hagemann G., Fritschy J. M. y Witte O.W. (2000) Differential downregulation of GABAA receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci.* 20: 5045- 5053.
262. Reding M.J., Orto L.A., Winter S.W., Fortuna I.M., Di Ponte P. y McDowell F.H. (1986) Antidepressant therapy after stroke. A double-blind trial. *Arch. Neurol.* 43: 763-765.
263. Reding M.J., Solomon B. y Borucki S.J. (1995) Effect of dextroamphetamine on motor recovery after stroke. *Neurology (suppl 4)* 45: A222.
264. Reyes B., Valentino R., Xu G. y Van Bockstaele E. (2005) Hypothalamic projections to locus coeruleus neurons in the rat brain. *Eur Jour Neurosc* 22: 93- 106.
265. Richter S., Gerwig M., Aslan B., Wilhelm H., Schoch B. y Dimitrova A. (2007) Cognitive functions in patients with MR-defined chronic focal cerebellar lesions. *J Neurol.* 254 (9): 1193–203.
266. Ridding M. C., Brouwer B., Miles T. S., y cols. (2000) Changes in muscle responses to stimulation of the motor cortex induced by peripheral nerve stimulation in human subjects. *Exp Brain Res* 131: 135– 43.
267. Rijntjes M. y Weiller C. (2002) Recovery of motor and language abilities after stroke: the contribution of functional imaging. *Prog Neurobiol* 66: 109– 22.
268. Ríos- Roemenets S., Castaño- Monsalve B., Bernabeu- Guitart M. (2007) Farmacoterapia de las secuelas cognitivas secundarias a traumatismo craneoencefálico. *Rev Neurol* 45: 563-70.
269. Rioult-Pedotti M. S., Friedman D., Hess G., y cols. (1998) Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci* 1: 230– 4.
270. Robertson I. H. y Murre J. M. (1999) Rehabilitation of brain damage: brain plasticity and principles of guided recovery. *Psychol Bull* 125: 544– 75.
271. Rodvalho G. V., Franci C. R., Morris M. y Anselmo-Franci J. A. (2006) Locus coeruleus lesions decrease oxytocin and vasopressin release induced by hemorrhage. *Neurochem Res* 31: 259- 266.

272. Roffler-Tarlov S., Schildkraut J.J. y Draskoczy P.R. (1973) Effects of acute and chronic of desmethylimpramine on the content of norepinephrine and other monoamines in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 22: 2923-2926.
273. Room P., Postema F., Korf., J. (1981) Divergent axon collaterals of rat locus coeruleus neurons: demonstration by fluorescent double labeling technique. *Brain Res* 221: 219- 30.
274. Ross R.A., Joh T.H., y Reis D.J. (1975) Reversible changes in the accumulation and activities of tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase in neurons of nucleus locus coeruleus during the retrograde reaction. *Brain Res.* 92: 57-72.
275. Rosen J, Stein D, Butters N. (1971) Recovery of function after serial ablation of prefrontal cortex in the rhesus monkey. *Science.* 994(173): 353-6.
276. Rossi S. y Rossini P. M. (2004) TMS in cognitive plasticity and the potential for rehabilitation. *Trends Cogn Sci* 8: 273– 9.
277. Rouach N., Glowinski J. y Giaume C. (2000) Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol* 149: 1513– 26.
278. Roy N. S., Wang S., Jiang L., y cols. (2000) In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 6: 271– 7.
279. Sabe L., Leiguarda R. y Starkstein S.E. (1992) An open-label trial of bromocriptine in nonfluent aphasia. *Neurology* 42: 1637-1638.
280. Sabe L., Salvarezza F., Cuerva A.G., Leiguarda R. y Starkstein S. (1995) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of bromocriptine in nonfluent aphasia. *Neurology* 45: 2272-2274.
281. Sachar E. J., Hellman L., Roffwarg H. P., Halpern F. S., Fukushima D.K. y Gallagher T. F. (1973) Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression. *Arch Gen Psychiatry* 28: 19– 24.
282. Salenius S. y Hari R. (2003) Synchronous cortical oscillatory activity during motor action. *Curr Opin Neurobiol* 13: 678– 84.
283. Sanai N., Tramontin A., Quinones-Hinojosa A., y cols. (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427: 740– 4.

284. Sanes J. N. y Donoghue J. P. (2000) Plasticity and primary motor cortex. *Ann Rev Neurosci* 23: 393– 415.
285. Sanes J. N., Donoghue J. P., Thangaraj V, y cols. (1995) Shared neural substrates controlling hand movements in human motor cortex. *Science* 268: 1775– 7.
286. Santamaría A., Ríos C (1993) MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett* 159:51–54
287. Schallert T. y Jones T.A. (1993) “Exuberant” neural growth after brain damage in adult rats: the essential role of behavioral experience. *J. Neural Transplant. Plast.* 4: 193-198.
288. Schallert T., Hernandez T.D. y Barth T.M. (1986) Recovery of function after brain damage: Severe and chronic disruption by diazepam. *Brain Res.* 379: 104-111.
289. Schallert T., Jones T.A., Weaver M.S., Shapiro L.E., Crippens D. y Fulton R. (1992) Pharmacologic and anatomic considerations in recovery of function. *Physic. Med. Rehab.* 6: 375-393.
290. Schambra U.B., Mackensen G.B., Stafford- Smith M., Haines D.E. y Schwinn D.A. (2005) Neuron specific alfa- adrenergic receptor expression in human cerebellum: implication for emerging cerebellar roles in neurological disease. *Neuroscience* 135: 507- 523.
291. Schweighofer N., Doya K. y Kuroda S. (2004) Cerebellar aminergic neuromodulation: towards a functional understanding. *Brain Res Brain Res Rev*; 44: 103- 116.
292. Schwenkreis P., Witscher K., Janssen F., y cols. (1999) Influence of the Nmethyl- D-aspartate antagonist memantine on human motor cortex excitability. *Neurosci Lett* 270: 137– 40.
293. Seitz R. J., Azari N. P., Knorr U., y cols. (1999) The role of diaschisis in stroke recovery. *Stroke* 30: 1844– 50.
294. Selzer M. E. (2003) Promotion of axonal regeneration in the injured CNS. *Lancet Neurol* 2: 157– 66.
295. Serteser M., Ozben T., Gümüslü S., Balkan E. (2001) Biochemical evidence of crossed cerebellar diaschisis in terms of nitric oxide indicators and lipid peroxidation products in rats during focal cerebral ischemia, *Acta Neurol. Scand.* 103:43–48.

296. Shanina E. V., Schallert T., Witte O. W. y Redecker C. (2006) Behavioral recovery from unilateral photothrombotic infarcts of the forelimb sensorimotor cortex in rats: role of the contralateral cortex. *Neuroscience* 139: 1495- 1506.
297. Shao Y y, McCarthy K.D. (1994) Plasticity of astrocytes. *Glia* 11: 147– 55.
298. Shimojo S. y Shams L. (2001) Sensory modalities are not separate modalities: plasticity and interactions. *Curr Opin Neurobiol.* 11: 505– 9.
299. Silveri M.C., DiBetta A.M., Filippini V., Leggio M.G. y Molinari M. (1998) Verbal short-term store-rehearsal system and the cerebellum. Evidence from a patient with a right cerebellar lesion. *Brain* 121: 2175– 2187.
300. Silvestrini M., Cupini L.M., Placidi F., Diomedi M. y Bernardi G. (1998) Bilateral hemispheric activation in the early recovery of motor function after stroke. *Stroke* 29: 1305-1310.
301. Smeets W.J. y González A. (2000) Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev* 33: 308- 379.
302. Stanton P.K. y Sarvey J.M. (1985) Blockade of norepinephrine-induced long-lasting potentiation in the hippocampal dentate gyrus by an inhibitor of protein synthesis. *Brain Res.* 361: 276-283.
303. Steindler D. A. Pincus DW. (2002) Stem cells and neurogenesis in the adult human brain. *Lancet* 359: 1047– 54.
304. Steindler, D.A. (1981) Locus coeruleus neurons have axons that branch to the forebrain and cerebellum. *Brain Res.* 223: 367- 73.
305. Stephens J., Goldberg G. y Demopoulos J.T. (1986) Clonidine reinstates deficits following recovery from sensorimotor cortex lesion in rats. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 67: 666-667.
306. Strick P. L., Dum R. P. y Fiez J. A. (2009) Cerebellum and non motor function. *Annu. Rev. Neurosci.* 32: 413- 434.
307. Stroemer R. P., Kent T. A. y Hulsebosch C. E. (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke.* 26: 2135- 2144.

308. Stroemer R.P., Kent T.A. y Hulsebosch C.E. (1994) Amphetamines permanently promote recovery following cortical infarction. Soc. Neurosci. Abstr. 20: 186.94.
309. Stroemer R.P., Kent T.A. y Hulsebosch C.E. (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. Stroke 26: 2135-2144.
310. Stroemer R.P., Kent T.A. y Hulsebosch C.E. (1998) Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. Stroke 29: 2381-2395.
311. Subbarao K.V., Richardson J.S (1990) Iron-dependent peroxidation of rat brain: a regional study. J Neurosci Res 26:224–232
312. Sutton R.L. y Feeney D.M. (1992) α -Noradrenergic agonists and antagonist affect recovery and maintenance of beam-walking ability after sensorimotor cortex ablation in the rat. Restor. Neurol. Neurosci. 4: 1-11.
313. Sutton R.L., Hovda D.A. y Feeney D.M. (1989) Amphetamine accelerates recovery of locomotor function following bilateral frontal cortex ablation in cats. Behav. Neurosci. 103: 837-841.
314. Sutton RL, Hovda DA, Chen MJ, Feeney DM. (2000) Alleviation of brain injury-induced cerebral metabolic depression by amphetamine: a cytochrome oxidase histochemistry study. Neural Plast. 7: 109-25.
315. Sziráky I., Mohanakumar K., Rauhala P. y cols. (1998) Manganese: a transition metal protects nigrostriatal neurons from oxidative stress in iron-induced animal model of parkinsonism. Neurosci 85: 1101- 1111.
316. Szot P., White S. S., Greenup J. L., Leverenz J. B., Peskind E. R. y Raskind M. A. (2006) Compensatory changes in the noradrenergic nervous system in the locus ceruleus and hippocampus of postmortem subjects with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. J Neurosci 11; 26: 467- 478.
317. Tanaka M., Kondo S., Hirai S., Ishiguro K., Ishihara T. y Morimatsu M. (1992) Crossed cerebellar diaschisis accompanied by hemiataxia: a PET study. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 55: 121-125.
318. Teasell R., Bayona N. A. y Bitensky J. (2005) Plasticity and reorganization of the brain post stroke. Top Stroke Rehabil. 12: 11- 26.

319. Teune T. M., Van der Burg J. y Ruigrok T.J. (1995) Cerebellar projections to the red nucleus and inferior olive originate from separate populations of neurons in the rat: a non-fluorescent double labeling study. *Brain Res* 673(2): 313–319.
320. Teune T. M., Van der Burg J., Van der Moer J., Voogd J. y Ruigrok T.J. (2000) Topography of cerebellar nuclear projections to the brain stem in the rat. *Prog Brain Res* 124: 141–172.
321. Thach W. T., Goodkin H. P. y Keating J. G. (1992) The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annu. Rev. Neurosci*, 15: 403- 442.
322. Thajeb P., Huang K. y Shih C. (1999) Diaschisis in chronic viral encephalitis with Koshevnikov syndrome. *J Neuroimag* 9: 122– 5.
323. Thajeb P., Shih B. y Wu M. (2001) Crossed cerebellar diaschisis in herpes simplex encephalitis. *Eur J Radiol* 38: 55– 8.
324. Theodore D.R., Meier-Ruge W. y Abraham J. (1992) Microvascular morphometry in primate diaschisis. *Microvas. Res.* 43: 147-155.
325. Thomas S., Prins M.L., Samii M., Hovda D.A. (2000) Cerebral metabolic response to traumatic brain injury sustained early in development: a 2-deoxy-d-glucose autoradiographic study. *J. Neurotrauma* 17: 649–665.
326. Tokuyama S., Zhu H., Seikwan Oh., Ing K. y Toshinori Yamamoto. (2001) Further evidence for a role of NMDA receptors in the locus coeruleus in the expression of withdrawal syndrome from opioids. *Neurochemistry International* 39: 103– 109.
327. Tomizawa Y., Hanawa T., Kuroda D. y cols. (2006) Corrosion of stainless steel sternal wire after long-term implantation. *J Artif Organs* 9:61-66.
328. Trachtenberg J. T., Chen B. E., Knott G. W., y cols. (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420: 788– 94.
329. Traversa R., Cicinelli P., Bassi A., Rossini P. M. y Bernardi G. (1997) Mapping of motor cortical reorganization after stroke. A brain stimulation study with focal magnetic pulses. *Stroke.* 28: 110- 117.
330. Triggs W.J., Willmore L.J. (1984) In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J Neurochem* 42:976–980

331. Uchino A., Takase Y., Nomiya K. y cols. (2006) Brainstem and cerebellar changes after cerebrovascular accidents: magnetic resonance imaging. *Eur Radiol* 16:592–597
332. Ullian E. M., Sapperstein S. K., Christopherson K. S., y cols. (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291: 657– 61.
333. Uttara B., Singh A.V., Zamboni P., Mahajan R.T. (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7:65–74
334. Van Hasselt P. (1973) Effect of butyrophenones on motor function in rats after recovery from brain damage. *Neuropharmacology* 12: 245-247.
335. Venero J.L., Revuelta M., Cano J. y cols. (1997) Time course changes in the dopaminergic nigrostriatal system following transection of the medial forebrain bundle: detection of oxidatively modified proteins in substantia nigra. *J. Neurochem.* 68: 2458-68.
336. Viltart O., Mairesse J., Darnaudey M., y cols. (2006) Prenatal stress alters Fos protein expression in hippocampus and locus coeruleus stress-related brain structures. *Psy Neu End* 31: 769- 780.
337. Von Monakow C. (1914) Die lokalisation im groshirn un der abbau der funktion durch kortikale herde. Wiesbaden, Germany: JF Bergman.
338. Walker-Batson D., Smith P., Curtis S., Unwin H. y Greenlee R. (1995) Amphetamine paired with physical therapy accelerates motor recovery after stroke – Further evidence. *Stroke* 26: 2254-2259.
339. Walker-Batson D., Smith P., Curtis S., y cols. (1995) Amphetamine paired with physical therapy accelerates motor recovery after stroke. Further evidence. *Stroke* 26: 2254– 9.
340. Walker-Batson D., Unwin H., Curtis S., Allen E., Wood M., Smith P., Devous M.D., Reynolds S. y Greenlee R.G. (1992) Use of amphetamine in the treatment of aphasia. *Restor. Neurol. Neurosci.* 14: 47-50.
341. Washburn M. y Moises H.C. (1989) Electrophysiological correlates of presynaptic alpha 2-receptor-mediated inhibition of norepinephrine release at locus coeruleus synapses in dentate gyrus. *J. Neurosci.* 9:2131-2140.

342. Waterhouse B.D., Lin C.S., Burne R.A., Woodward D.J. (1983) The distribution of neocortical projection neurons in the locus coeruleus, *J. Comp. Neurol.* 217:418–431
343. Weiller C. (1998) Imaging recovery from stroke. *Exp Brain Res* 123: 13– 7.
344. Wingstrom H. y Gustafsson B. (1985) Facilitation of hippocampal long-lasting potentiation by GABA antagonists. *Acta Physiol. Scand.* 125: 159-172.
345. Wise S. P., Moody S. L., Blomstrom K. J., y cols. (1998) Changes in motor cortical activity during visuomotor adaptation. *Exp Brain Res* 121: 285– 99.
346. Xerri C. (1998) Post-lesional plasticity of somatosensory cortex maps: a review. *C R Acad Sci III* 321: 135– 51.
347. Yamasoba T., Schacht J., Shoji F., Miller J.M. (1999) Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor *in vivo*, *Brain Res.* 815 (1999) 317–325.

ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTE TRABAJO

Pontine and Cerebellar Norepinephrine Content in Adult Rats Recovering from Focal Cortical Injury

Rigoberto Gonzalez-Pina · Antonio Bueno-Nava · Sergio Montes · Alfonso Alfaro-Rodriguez · Angelica Gonzalez-Maciel · Rafael Reynoso-Robles · Fructuoso Ayala-Guerrero

Accepted: 5 October 2006 / Published online: 9 November 2006
© Springer Science+Business Media, LLC 2006

Abstract Norepinephrine (NE) plays an important role in motor recovery after brain damage. Most studies concerning NE activity have been performed in the cerebellum, while the role of the pons, the site where the norepinephrinergic locus coeruleus is located, has not yet been elucidated. For this work, we studied the changes in cerebellar and pontine NE content in sham-operated ($n = 17$), motor cortex injured ($n = 6$) and recovered rats ($n = 12$). Motor effects were assessed by means of footprint analysis and sensorimotor evaluation. It was found that after cortical brain damage, the stride length decreases while the stride angle increases after 6 h post-surgery, while the sensorimotor evaluation showed an increase in the motor deficit. Recovery was observed after 24 h. NE content increased in the pons after 6 h and returned to normal levels in recovered rats, with no significant

changes observed in the cerebellum. Based on the functional remote inhibition, it is possible that NE exerts an autoinhibitory effect in the pons after motor cortical ablation. On the other hand, the absence of an effect in the cerebellum suggests that cerebellar NE activity related to damage and/or recovery is limited to discrete areas of the structure.

Keywords Norepinephrine · Brain injury · Pons · Cerebellum · Diaschisis

Introduction

Recovery from hemiplegia has been documented in both experimental animals [1, 2] and humans after stroke [3]. It has been suggested that norepinephrine (NE) plays an important role in the recovery after brain insult [4]. Administration of D-amphetamine enhances recovery [5], and intraventricular infusion of NE [6] or 1-threo-3,4 dihydroxy-phenyl-serine, a NE precursor [7], protects from the effects of motor cortex injury. The cerebellum has been the structure most often studied [8] in which a NE decrease after motor cortex ablation has been observed [9, 10]. This fact seems to be part of a functional depression of metabolic processes in the cerebellum, a remote and intact brain area related with the injured site, a phenomena known as diaschisis. Since NE seems to be involved in such a depression, the NEergic locus coeruleus (LC) is then also implicated. The LC is located adjacent to the fourth ventricle in the pontine brainstem [11] and it is the primary source of NE in the central nervous system [12]. Several lines of evidence indicate that spontaneous functional

R. Gonzalez-Pina (✉) · A. Bueno-Nava
Laboratorio de Neuroplasticidad, Torre de Investigación,
Instituto Nacional de Rehabilitación, Calz. Mexico-
Xochimilco 289 Col. Arenal de Guadalupe, Del. Tlalpan,
C.P. 14389 Mexico City, Mexico
e-mail: higgs65@salud.gob.mx

S. Montes
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S.
SSA, Mexico City, Mexico

A. Alfaro-Rodriguez
Laboratorio de Neuroquímica, INR SSA, Mexico City,
Mexico

A. Gonzalez-Maciel · R. Reynoso-Robles
Instituto Nacional de Pediatría, SSA, Mexico City, Mexico

F. Ayala-Guerrero
Facultad de Psicología, UNAM, Mexico City, Mexico

recovery from hemiplegia is mediated, in part, by LC NEergic mechanisms [13, 14]. For example, lesions in the LC result in a difficult recovery period after brain injury [15], while administration of yohimbine and idaxozan, two α 2-adrenoceptor antagonists that enhance LC NEergic input, accelerate the rate of recovery [16]. Conversely, clonidine, prazosin and phenoxibenzamine, drugs that decrease LC NEergic transmission, result in a difficult recovery and restore deficits in animals previously recovered from cortical injuries [16, 17]. Moreover, anatomical relationships between the LC and cortex [18] and the LC and cerebellum [19] have been described, suggesting that cerebellar NE depletion found in cortically injured animals may be mediated by NE changes in the LC. However, the condition of the cerebellar and pontine NE contents after cortical ablation and after recovery is achieved is not currently known. Thus, the aim of this work was to measure the cerebellar and pontine NE levels in non-injured, injured and recovered rats after motor cortical ablation.

Experimental procedure

We used 35 male wistar rats (weight 280–300 g) provided by the vivarium of Instituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia MVS, where they were reared (courtesy of MVZ Rodolfo Perez Madrigal). Animals were fed with Purina rodent laboratory chow and maintained on a 12–12 light–darkness schedule.

Rats were adapted to the laboratory conditions at least 1 week prior to the surgeries. During this time, rats were handled daily in order to habituate them to the experimental manipulations, and a training protocol was performed in order to obtain their footprints, as described by Gonzalez-Pina et al. [20]. Rats were treated according to the Guide for the Care and Use of Experimental Animals [21]. We used the minimal possible number of animals using bioethical and statistical criteria, according to Festing [22].

Once training was completed, a basal recording of the footprint was performed. Immediately after that, animals were anesthetized with Ketamine–Xylazine (100 mg/kg–5 mg/kg). Then, the rats were mounted in a stereotaxic frame (David Kopf). The skull was exposed by means of an incision on the scalp and a trephine hole was made (1 mm diameter, approximately). The meninges were cut using the tip of a syringe needle. Seventeen rats were sham-operated, while 18 were injured by means of the aspiration of the tissue of the right motor cortex representative of the hindlimb [23],

located in the following coordinates: posterior 2 mm and lateral 2 mm with respect to the bregma. Aspiration was performed using a vacuum pump (Stoelting 6C) coupled to a glass pipette (1 mm diameter). Finally, the scalp was sutured with catgut No. 00 and postoperative care was provided as recommended by Gonzalez-Pina and Escalante-Membrillo [24]. Nearly 1 h after the ablation was performed, the rats were fully awakened and the motor evaluations were performed.

Six of the injured rats and six of the sham-operated were recorded from one time before surgery and again 3 h after that the surgery was performed. Then, records and scores were taken every hour for 4 h, which corresponded to 6 h post-surgery. These animals were evaluated using a sensorimotor evaluation protocol according to García et al. [25]. These methods evaluations were used to assess the animals because the recording time is shorter than that required for footprint analysis and therefore are more adequate to measure the early sensorimotor effects of the cortical ablation. Sensorimotor evaluation consisted in the use of four tests [25]. Symmetry in the movements of four limbs (SMFL) and climbing (C) evaluated motor performance, while response to vibrissae touch (RVT) and body proprioception (BP) evaluated sensory aspects (see ref. [25] for details). The feasibility and reliability of this examination have been described by Pantoni et al. [26]. Finally, animals were sacrificed in order to analyze NE content.

The remaining 12 injured and the 11 sham-operated rats were recorded exclusively for the footprint analysis 6 h after surgery and every 6 h after that for 48 h, according to the method of Gonzalez-Pina et al. [20]. After the behavioral assessment was performed, all rats were sacrificed by decapitation. Animals were currently sacrificed between 18:00 and 19:00 h in order to avoid NE variations due to the circadian rhythm. The brain was removed and placed on a cool plate in order to extract the pons and cerebellum, which was divided into right and left sides each. Tissue was collected in teflon tubes and a solution of 0.5 ml of perchloric acid 0.4 N containing 0.1% w/v of sodium metabisulfite was added. Then the tissues were homogenized and centrifuged at 15,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was filtered and stored at –70°C for chromatographic analysis. The content of NE was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC, Perkin-Elmer LC-250) coupled to a metrohm electrochemical detector. The peaks were sent to a computer with a Perkin-Elmer 1020 Plus program. In order to determine the concentrations of NE, the chromatograms of the samples were interpolated with

the chromatogram obtained from four standard samples, whose NE concentrations were known. An analytical column for catecholamines was used (ALLTECH, adsorbosphere C18 100 × 4.8 mm, 3 μm of particle size). The mobile phase utilized consisted of a phosphate buffer solution (0.1 mM, pH 3.2) that contained (in mM): sodium octyl sulfate (0.2), EDTA (0.1) and methanol (15% v/v). The flow rate employed was 1.2 ml/min while the potential was set at 0.65 V against a reference electrode of Ag/AgCl.

The encephalus was placed in a 10% formalin-buffer solution in order to delineate the lesion by means of the Kluver–Barrera stain. Following observation by light microscopy, the cavity was outlined on schemes taken from the Paxinos and Watson's stereotaxic atlas [27].

From the sensorimotor evaluation, comparisons were made between sham and motor ablation groups using a non-correlated Mann–Whitney's U test. From the footprints, we analyzed the percent of change with respect to baseline in the length, width and the angle of the stride. Comparisons between groups were also analyzed by means of a non-correlated Mann–Whitney's U test. NE analysis was performed by means of a one-way ANOVA and a pos hoc Tukey test. In all the cases, significant levels were set to $P \leq 0.05$.

Results

After the cerebral coronal slices were processed, we observed that the cavity corresponding to the lesion started –1.6 mm from the bregma (Fig. 1A), increased to a maximum between –2.56 mm and –2.80 mm (Fig. 1B), and then decreased to a final size between –3.14 mm and –3.60 mm (Fig. 1C), covering the entire motor hindlimb cortical representation, according to Hall and Lindholm [23].

Sensitive assessment did not show any additional changes (data not shown). However, motor assessment showed a notorious and sustained increase in the motor deficit in injured animals. Such changes started 3 h after the surgery ($P \leq 0.001$), achieving a maximal score 5 ($P \leq 0.0001$) and 6 ($P \leq 0.0001$) hours after that the lesion was performed (Fig. 2).

Footprint analysis showed that injured animals had a significant decrease in the stride's length after 6 h ($-8.00\% \pm 2.4$; $P \leq 0.001$; Fig. 3A), with a concomitant increase in the stride's angle ($22.11\% \pm 4.65$; $P \leq 0.003$; Fig. 3B), while the stride's width did not show any significant change. As shown in the figures, recovery was observed 24 h after injury, since the mean percentage of change with respect to the

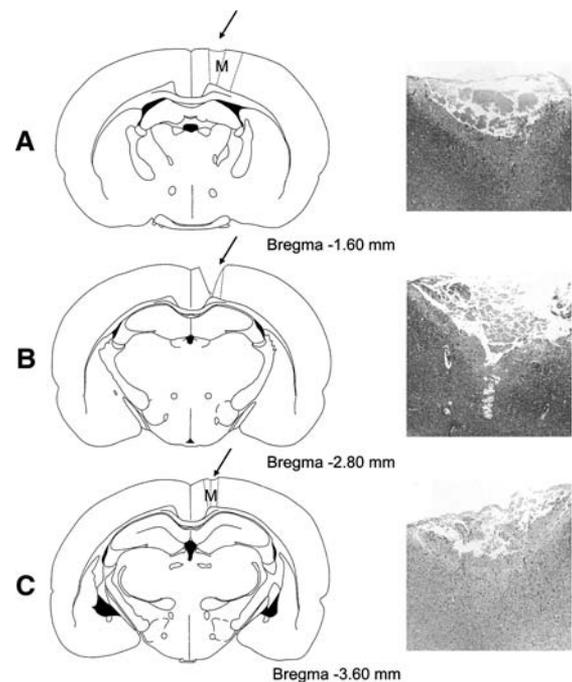


Fig. 1 Schematic representation showing the extent of the lesion (left), and microphotographs (10×) taken from the equivalent places in one typical slice (right). After the microscopic observations were performed, the cavity was outlined on the equivalent schemes taken from the Paxinos and Watson's stereotaxic atlas [27]. It is observed in both, schemes and photomicrographs, that the lesion was circumscribed to the motor cortex in the hindlimb representative area. In **A** and **C** the primary motor cortex border is affected (M), while in the injured area, a portion of the somatosensory cortex (**B**) was also affected. However, the lack of somatosensory effects suggests that the size of the lesion in such an area is not significant

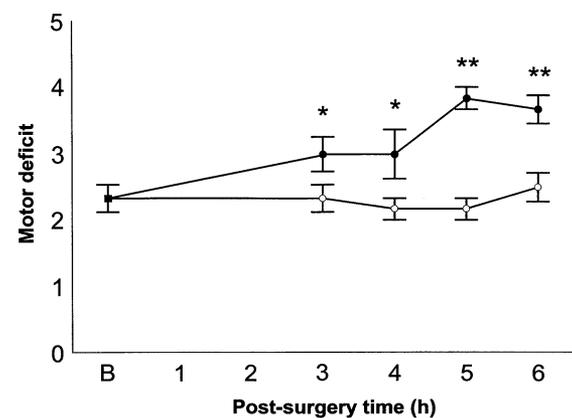


Fig. 2 Early motor deficit found in injured rats and compared with sham-operated rats. After 3 h of surgery, the injured animals showed important increases in motor deficits. Such effects were observed for 4 h until 6 h post-surgery had passed. Data are expressed as mean \pm s.e.m. ■ Basal record (B) prior to either sham or injury surgeries; ○ Sham operated rats; ● injured rats; Mann–Whitney's U test * $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.0001$

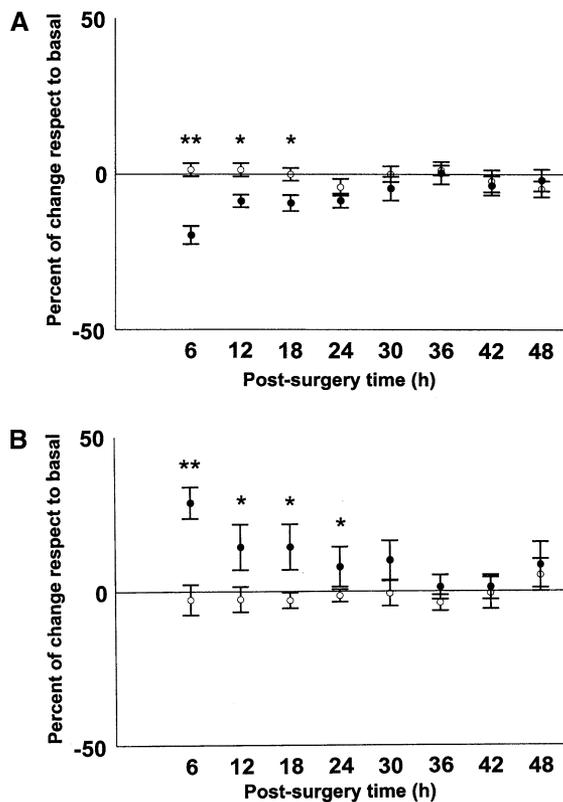


Fig. 3 Parameters measured in the footprints. Since the stride's width did not show any significant differences, such data are not presented. **(A)** Percent of change with respect to baseline in the stride's length, measured every 6 h for 48 h post-surgery. An important decrease after 6 h in injured animals was observed. Recovery was observed 24 h post-lesion and was maintained over the next 24 h. Data are expressed as mean \pm s.e.m. Mann-Whitney's U ($*P < 0.05$, $**P \leq 0.01$). ○ Sham operated rats; ● injured rats. **(B)** Percent of change with respect to baseline in the stride's angle, where a significant increase after 6 h post-lesion was observed. Recovery was observed 30 h post-lesion, although after 24 h a marginally significant difference was observed. Recovery was sustained for at least 48 h. Results are expressed as mean \pm s.e.m. Mann-Whitney's U ($*P < 0.05$, $**P \leq 0.01$). ○ Sham operated rats; ● injured rats

baseline was not significant when the sham group was compared to the injured one. Such a recovery was sustained for 48 h post-lesion.

When the mean total content of NE was analyzed in either the right or left pontine sides, it was found that rats 6 h after injury showed a significant increase (in ng/g of fresh tissue) in NE (9.76 ± 0.72) in the right hemisphere when they were compared with sham-operated after 6 h of surgery (6.54 ± 0.79 , not shown in plot), sham-operated after 48 h of surgery (6.76 ± 0.87) and recovered rats (6.32 ± 0.71). The same pattern of change was found in the left hemisphere ($P \leq 0.017$; Fig. 4). There were no significant differences between NE levels found in both pontine sides in each individual rat.

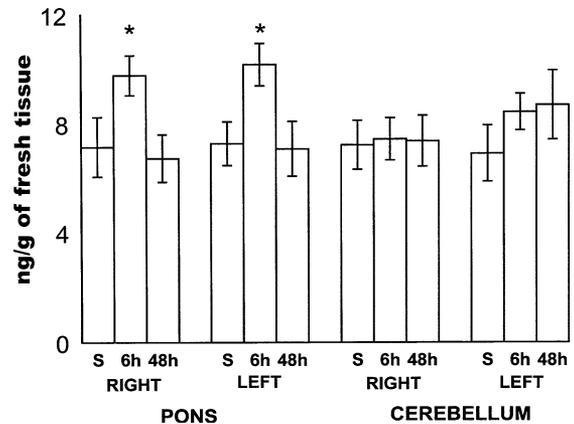


Fig. 4 Mean total content of pontine and cerebellar norepinephrine found in sham-operated rats sacrificed 48 h after of surgery (S), rats injured and sacrificed 6 h post-lesion (6 h) and rats injured and sacrificed 48 h post-lesion (48 h). Determinations were performed separately in the right and left side of the pons and in the left and right hemispheres of the cerebellum. The right and left sides in the pons of injured rats (6 h) showed an increase in NE, while such levels in recovered rats (48 h) were close to those of the sham-operated rats (One-way ANOVA, $*P < 0.05$). On the other hand, significant differences in the cerebellar hemispheres (Right $P = 0.791$, left $P = 0.522$) were not detected. Data are expressed as mean \pm s.e.m

Therefore, cerebellar NE content did not show any significant difference between the right ($P \leq 0.723$) and left ($P \leq 0.565$) hemispheres.

Discussion

Footprint analysis showed that motor performance is recovered after just 24 h, unlike most of the literature, in which motor recovery is achieved 4–6 days post-lesion [1]. This could be due to the extent of the discrete lesion that we used, limiting damage to the somatosensory area. This is a considerable advantage because it allowed us to study the recovery mechanisms in a short period of time. In this context, footprint analysis and early motor assessment showed that when rats expressed the strongest injury-induced effects, pontine NE content was elevated, and when animals recovered, pontine NE content was found to have returned to levels similar to these found in sham-operated rats after 48 h of surgery.

It is known that innervation from the LC to the motor cortex (MCX) is ipsilateral [19]. So, it is to be expected that an injury in the MCX will produce an ipsilateral effect on the LC. However, we found an increase in NE in both sides of the pons. There is strong evidence that behavioral effects of motor cortical injury results from functional depression in

remote but intact brain areas related with the injured site [28]. If NE increase in pons is part of such functional depression, we propose that this fact represents a norepinephrinergic pontine autoinhibitory mechanism. Pharmacological observations suggest that inhibition of NE release on postsynaptic target cells could be mediated by α 2-adrenoceptors [29, 30], widely distributed in the LC neurons. Thus, the binding of pontine NE to such receptors in the LC, enhanced by the observed NE increase, could produce the decreased NE release previously reported in cerebellum after MCX injury, as assessed by microdialysis [10]. Specifically, the α 2A-receptor subtype could be involved, since it is found in 100% of the rat's LC neurons [31], and, it has been reported that an α 2-receptor agonist inhibited release of NE by 96% [32]. The inhibitory action of NE has also been observed in other brain areas, such as the acetylcholine NE-induced inhibition in the tegmental nuclei [33].

Although we found that the pontine NE content is altered 6 h after injury, we provide evidence that remote inhibition of the pons could start as soon as 3 h after brain injury, since early motor evaluation showed motor deficits during this time period. Thus, remote inhibition of the pons could be almost immediate to the lesion. However, a limitation to the method employed for early motor evaluation is that the assessment is less quantitative than the footprint. Instead, the footprint is a long-term duration assessment. This is why it was necessary to use both complementary tests.

On the other hand, it is unclear how unilateral cortical injury results in bilateral increase of total NE levels in the pons, since innervation between the LC and cortex is predominantly ipsilateral [19]. It is possible that the effects of the unilateral MCX injury have an influence on both pontine sides [10]. Instead, the LC innervation to the cerebellum is bilateral [34] and the effects of MCX injury in the cerebellum may lead to bilateral retrograde effects within the LC neurons. However, we not observed changes in the cerebellar NE levels. Most of the literature has shown that cerebellar NE is involved in the mechanisms leading recovery. A decrease in cerebellar NE has been reported after cortical injury [35, 36], and such levels return to normal values when amphetamine is administered [34]. It has also been reported that cerebellar NE infusions facilitate recovery after sensorimotor cortex injury [35]. Such facts strongly support a cerebellum NE-mediated mechanism to achieve recovery after brain injury. The absence of changes in cerebellar NE content in our experiments indicates that NE activity in the cerebellum related to recovery from motor cortical ablation is confined

to discrete regions, such as the cerebellar cortex. It is known that the ventral and dorsal portions of the LC innervate all of the neurons of the cerebellar cortex and, to a lesser extent, the cerebellar nuclei [37, 38].

Our results suggest that diaschisis is involved because we have the presence of a cerebral injury circumscribed, a neuronal basis for the functional depression, the participation of a remote structure related with the lesion site (the pons), anatomical relationships between the pons and the cortex and the process is reversible [39], as was observed by the footprint analysis and the NE content after 48 h of brain injury surgery.

Thus, we demonstrate that pontine NE is increased in animals after brain damage and this is concomitant with an increase in the motor deficit, suggesting that remote functional inhibition could be mediated by NE increase and no decreases, as it could seems. On the other hand, we found that when motor performance is recovered, animals showed pontine NE levels very similar to these found in sham-operated rats after 48 h of surgery, suggesting an important role of the pons in the cerebellar inhibition after cortical injury, previously reported by others. Therefore, lack of effects on cerebellar NE content opens the need to search for specific cerebellar areas related to recovery after cortical brain injury.

The relevance of this study of the biochemical mechanisms leading to the recovery after brain injury is that this information is a determining factor for the development of pharmacological strategies that enhance recovery in humans. It must be noted that the results of clinical experience are very similar to those observed in experimental animals [4], suggesting that the mechanisms observed in the basic research are comparable between rats and man. Then, it must be regarded that the clinical use of NE agonists and antagonists such as antidepressants and ansiolytics in humans after stroke could alleviate or extend to the remote neuronal depression, facilitating or hindering functional recovery. Most studies are needed in order to elucidate the detailed mechanisms underlying brain recovery after injury. Particularly, the specific role of LC in the norepinephrinergic functional depression must be clarified. We have provided here evidence of that pontine NE increase is closely related to the motor deficit produced by motor cortical injury. However, it is needed to provide evidence about a more precise correlation between NE and recovery using other neurochemical approaching, such as in vivo microdialysis sampling.

Acknowledgments The authors wish to thank Dr. Camilo Ríos for his support in the neurochemical analysis, and Jesús Espinoza-Villanueva, who helped us in the histological preparation of tissues.

References

- Brailowsky S, Knight RT, Blood K (1986) gamma-Aminobutyric acid-induced potentiation of cortical hemiplegia. *Brain Res* 362:322–330
- Hovda DA, Feeney DM (1984) Amphetamine with experience promotes recovery of locomotor function after unilateral frontal cortex injury in the cat. *Brain Res* 298:358–361
- Katz DI, Alexander MP, Klein RB (1998) Recovery of arm function in patients with paresis after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 79:5488–5493
- Goldstein LB (2000) Effects of amphetamines and small related molecules on recovery after stroke in animals and man. *Neuropharmacology* 39:852–859
- Sutton RL, Hovda DA, Chen MJ, Feeney DM (2000) Alleviation of brain injury-induced cerebral metabolic depression by amphetamine: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neural Plast* 7:109–125
- Boyeson MG, Feeney DM (1990) Intraventricular norepinephrine facilitates motor recovery following sensorimotor cortex injury. *Pharmacol Biochem Behav* 35:3497–3501
- Kikuchi K, Nishino K, Ohyu H (2000) Increasing CNS norepinephrine levels by the precursor L-DOPS facilitates beam-walking recovery after sensorimotor cortex ablation in rats. *Brain Res* 860:130–135
- Boyeson MG, Krobert KA, Grade CM, Scherer PJ (1992) Unilateral, but not bilateral, locus coeruleus lesions facilitate recovery from sensorimotor cortex injury. *Pharmacol Biochem Behav* 43:771–777
- Gonzalez-Pina R, Bueno-Nava A, Escalante-Membrillo C, Montes S, Gonzalez-Maciél A, Ayala-Guerrero F (2003) Cerebellar and pontine norepinephrine contents after motor recovery in rats. *Res Neurol Neurosci* 21:219–220
- Krobert KA, Sutton RL, Feeney DM (1994) Spontaneous and amphetamine-evoked release of cerebellar noradrenaline after sensorimotor cortex contusion: an in vivo microdialysis study in the awake rat. *J Neurochem* 62:2233–2240
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Rev* 42:33–84
- Aston-Jones G, Rajkowski J, Cohen J (2000) Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. *Prog Brain Res* 126:165–182
- Gladstone DJ, Black SE (2000) Enhancing recovery after stroke with noradrenergic pharmacotherapy: a new frontier? *Can J Neurol Sci* 27:97–105
- Boyeson MG, Scherer PJ, Grade CM, Krobert KA (1993) Unilateral locus coeruleus lesions facilitate motor recovery from cortical injury through supersensitivity mechanisms. *Pharmacol Biochem Behav* 44(2):297–305
- Goldstein LB, Bullman S (1997) Effects of dorsal noradrenergic bundle lesion on recovery after sensorimotor cortex injury. *Pharmacol Biochem Behav* 58:1151–1157
- Sutton RL, Feeney DM (1992) α -noradrenergic agonist and antagonist affect recovery and maintenance of beam-walking ability after sensorimotor cortex ablation in the rat. *Restor Neurol Neurosci* 4:1–11
- Dunn-Meynell AA, Yarlagadda Y, Levin E (1997) Alpha 1-adrenoceptor blockade increases behavioral deficits in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 14:43–52
- Waterhouse BD, Lin CS, Burne RA, Woodward DJ (1983) The distribution of neocortical projection neurons in the locus coeruleus. *Comp Neurol* 217:418–431
- Steindler DA (1981) Locus coeruleus neurons have axons that branch to the forebrain and cerebellum. *Brain Res* 223:367–373
- Gonzalez-Pina R, Bueno-Nava A, Montes S, Alfaro-Rodríguez A, Gonzalez-Maciél A, Reynoso-Robles R, Ayala-Guerrero F (2005) Pontine norepinephrine content after motor cortical ablation in rats. *Proc West Pharmacol Soc* 48:73–76
- Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA (1993) Guide for the care and use of experimental animals. *Can Council Animal Care* 1:211
- Festing MFW (1994) Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab Anim Sci* 28:212–221
- Hall RD, Lindholm EP (1974) Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Res* 66:23–38
- Gonzalez-Pina R, Escalante-Membrillo C (2000) Algunas consideraciones bioéticas en los estudios de sueño simultáneos al muestreo neuroquímico en animales con libertad de movimientos. *Animales de experimentación* 6:26–32
- García JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ (1995) Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 26:627–635
- Pantoni L, Bartolini L, Pracucci G, Inzitari D (1998) Interrater agreement on a simple neurological score in rats. *Stroke* 29:871–872
- Paxinos G, Watson C (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Australia
- Serteser M, Ösben T, Gümüşlü S, Balkan S, Balkan E (2001) Biochemical evidence of crossed cerebellar diaschisis in terms of nitric oxide indicators and lipid peroxidation products in rats during focal cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand* 103:43–48
- Washburn M, Moises HC (1989) Electrophysiological correlates of presynaptic alpha 2-receptor-mediated inhibition of norepinephrine release at locus coeruleus synapses in dentate gyrus. *J Neurosci* 9:2131–2140
- Nasseri A, Minneman KP (1987) Relationship between alpha 2-adrenergic receptor binding sites and the functional receptors inhibiting norepinephrine release in rat cerebral cortex. *Mol Pharmacol* 32:655–662
- Smeets WJ, Gonzalez A (2000) Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev* 33:308–379
- Bucheller MM, Hadamek KK, Hein L (2002) Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 109:819–826
- Hobson JA, McCarley RW (1977) The brain as a dream state generator: an activation-synthesis hypothesis of the dream process. *Am J Psychiatry* 134:1335–1348
- Room P, Postema F, Korf J (1981) Divergent axon collaterals of rat locus coeruleus neurons: demonstration by a fluorescent double labeling technique. *Brain Res* 221:219–230
- Boyeson MG, Krobert KA (1992) Cerebellar norepinephrine infusions facilitate recovery after sensorimotor cortex injury. *Brain Res Bull* 29:435–439

36. Krobert KA, Sutton RL, Feeney DM (1994) Spontaneous and amphetamine-evoked release of cerebellar noradrenaline after sensorimotor cortex contusion: an in vivo microdialysis study in the awake rat. *J Neurochem* 62:2233–2240
37. Schambra UB, Mackensen GB, Stafford-Smith M, Haines DE, Schwinn DA (2005) Neuron specific alfa-adrenergic receptor expression in human cerebellum: implication for emerging cerebellar roles in neurologic disease. *Neuroscience* 135:507–523
38. Schweighofer N, Doya K, Kuroda S (2004) Cerebellar aminergic neuromodulation: towards a functional understanding. *Brain Res Brain Res Rev* 44:103–116
39. Feeney DM, Baron JC (1986) Diaschisis. *Stroke* 17:817–830

Caracterización de la conducta motora en ratas con ablación cortical

R. González-Piña^a, A. Bueno-Nava^b, A. Alfaro-Rodríguez^c, J.A. Durand-Rivera^d

CARACTERIZACIÓN DE LA CONDUCTA MOTORA EN RATAS CON ABLACIÓN CORTICAL

Resumen. Introducción. El modelo de ablación cortical en ratas se ha utilizado para estudiar los mecanismos básicos de recuperación funcional, pero no hay datos respecto a los efectos de la lesión sobre las manifestaciones conductuales motoras y somatosensoriales que permitan categorizar estas secuelas como un modelo de hemiplejía. Materiales y métodos. Se utilizaron 35 ratas machos Wistar (280-300 g), distribuidas en dos grupos: control (n = 17) y con lesión cerebral por ablación cortical (n = 18). Previo entrenamiento, se tomaron registros de la impresión de la huella y de las evaluaciones motora y somatosensorial antes de la cirugía de lesión. Seis horas después de la lesión se realizaron nuevamente las pruebas conductuales y se registró la actividad ambulatoria espontánea. Resultados y conclusiones. Se encontró que la lesión disminuye la longitud e incrementa el ángulo de la zancada y el déficit motor, sin afectar los aspectos somatosensoriales ni la actividad ambulatoria espontánea. Estos hallazgos se discuten en función de las características motoras de las secuelas hemiparéticas comunicadas en humanos. [REV NEUROL 2008; 47: 304-9]

Palabras clave. Conducta motora. Daño cerebral. Desplazamiento. Hemiplejía. Ratas.

INTRODUCCIÓN

La ablación cortical en la rata se ha empleado para estudiar los mecanismos básicos que subyacen a la recuperación funcional después del daño cerebral y algunos autores han sugerido que las secuelas semejan las manifestaciones clínicas de la hemiplejía en los humanos. Según la definición de Ferreras-Valenti y Rozman [1], la hemiplejía es la pérdida de la facultad para realizar movimientos dominados por la acción voluntaria, circunscrita en la mitad derecha o izquierda a partir del plano corporal medio. Debe su origen a las alteraciones de la vía piramidal y extrapiramidal [2] producidas por accidentes vasculares cerebrales, traumatismo craneoencefálico o, en menor medida, tumores cerebrales y procesos infecciosos [3]. Puesto que conlleva un problema importante de discapacidad, tanto sus manifestaciones clínicas como su evolución se han venido estudiando desde hace décadas [4,5] y se han conseguido avances notables en su conocimiento, que han permitido el desarrollo y el perfeccionamiento de terapias de rehabilitación [6], resultado que resalta la importancia de intensificar las investigaciones en esta área. También se ha informado ampliamente de la recuperación espontánea de las secuelas motoras, tanto en animales de experimentación dañados –por medio de ablación cortical o ligadura de la arteria cerebral media [7-9]– como en humanos convalecientes de ictus [10]. Los avances en los mecanismos de recuperación funcional han permitido incluso la elaboración de métodos predictivos [11] que todavía no se han introducido en la

práctica clínica, pero que serían de invaluable utilidad para el tratamiento de la discapacidad.

Básicamente, las secuelas del daño cerebral se evalúan en las ratas mediante el paradigma de la viga de equilibrio como un indicador de la recuperación [9,12], que consiste en entrenar a la rata para que pase caminando sobre una viga de madera de 2,5 × 200 cm elevada del suelo a una distancia mínima de 30 cm. La calificación se otorga en forma de una puntuación ordinal que va de 0 a 24, en la cual la calificación más alta corresponde al mayor déficit motor. Algunos autores han discutido la participación de neurotransmisores específicos que aceleran o retardan la recuperación funcional después del daño cerebral en las ratas, cuyas deficiencias tras la lesión se miden con el paradigma anteriormente descrito. Entre estos neurotransmisores destaca la noradrenalina [12]. La experimentación con fármacos que incrementan la actividad del sistema noradrenérgico ha mostrado que la administración de amfetamina, una sustancia que incrementa las concentraciones de noradrenalina, disminuye rápidamente el déficit motor en las ratas [12] y restablece los movimientos voluntarios en los pacientes hemipléjicos [13], lo que sugiere la posibilidad de que los mecanismos básicos que subyacen a la recuperación funcional sean similares en las dos especies. Estos hallazgos plantean la necesidad de caracterizar conductualmente el modelo animal, pues no se han descrito con detalle las diferentes manifestaciones clínicas conductuales de las ratas después de la ablación cortical. El conocimiento derivado de este estudio permitirá establecer semejanzas y diferencias con la hemiplejía que se observa en el humano, y contribuirá a delimitar las áreas conductuales en las cuales el modelo animal es útil para la intervención clínica.

Aceptado tras revisión externa: 04.06.08.

^aLaboratorio de Neuroplasticidad. ^bLaboratorio de Cromatografía y Microdiálisis. ^cLaboratorio de Neuroquímica. ^dLaboratorio de Neuroprotección. Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA. México DF, México.

Correspondencia: Dr. Rigoberto González-Piña. Laboratorio de Neuroplasticidad. Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA. Calz. México-Xochimilco, 289. Col. Arenal de Guadalupe. Deleg. Tlalpan. México DF. CP 14389. México. E-mail: higo65@salud.gob.mx

Agradecimientos. A la Dra. A. González-Maciel, por su valiosa asistencia técnica tanto en la recogida de datos como en la preparación de los tejidos para delimitar la lesión.

© 2008, REVISTA DE NEUROLOGÍA

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 35 ratas machos de la cepa Wistar (280-300 g) proporcionadas por el criadero del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS (cortesía del médico veterinario y zootécnico Rodolfo Pérez Madrigal). Los animales recibieron alimento especial para roedores de laboratorio (Purina[®]) y se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas. Se les

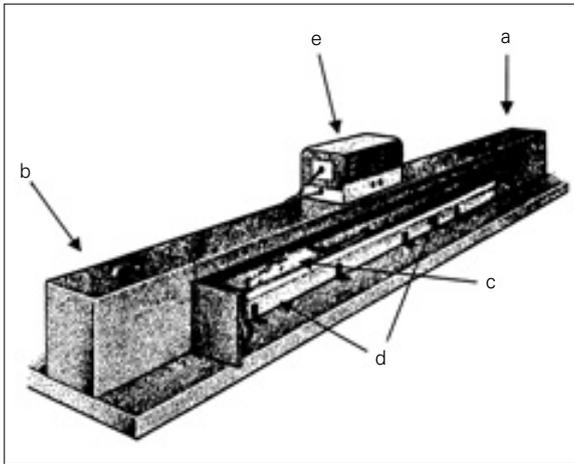


Figura 1. Esquema del corredor empleado en el registro de la impresión de la huella. a) Caja de salida. b) Caja de llegada. c) Rata pasando a través del cuerpo del corredor con las patas entintadas. El suelo de esta parte está cubierto con una tira de papel en la que las huellas quedan impresas. d) Rieles metálicos conectados a un generador de choques eléctricos, mediante los cuales se administran corrientes eléctricas muy suaves y que se utilizan durante la fase de entrenamiento para castigar las respuestas indeseadas. e) Generador de choques eléctricos.

trató de acuerdo con la guía para el cuidado y el uso de los animales de experimentación [14] y se utilizó el menor número posible de ejemplares, aplicando criterios bioéticos y estadísticos, según las recomendaciones de Festing [15]. Todas las ratas pasaron un período de adaptación a las condiciones del laboratorio de al menos una semana antes de la cirugía, tiempo durante el cual se manipularon diariamente con el objeto de habituarlas a las maniobras experimentales y 23 de ellas se sometieron al protocolo de entrenamiento para obtener sus huellas impresas descrito por González-Piña et al [7]. Para esto se utilizó un corredor de madera de 100 cm de longitud, en cuya superficie se colocaba una tira de papel de $6,8 \times 100$ cm cada vez que se introducía una rata. Este dispositivo tenía en el extremo derecho una caja de salida con suelo metálico y en el extremo izquierdo una caja de llegada. En cada uno de los costados del corredor había un riel de aluminio (Fig. 1). Los animales se colocaban siempre en el dispositivo con las patas entintadas. El entrenamiento se realizó en cuatro fases, tal como se describe a continuación:

- El primer día las ratas se pusieron en la caja de salida durante cinco minutos con la puerta de acceso al corredor cerrada.
- Durante el segundo día, las ratas se colocaron durante cinco minutos en esta misma caja con las puertas abiertas y permitiendo la libertad de movimientos entre la caja y el corredor.
- En el tercer día las ratas se colocaron en la caja de salida cerrada durante cinco segundos antes de abrir la puerta de acceso al corredor. Una vez que ésta estuvo abierta, si el animal alcanzaba la caja de llegada, se devolvía a su jaula y se desechaba la tira de papel con sus huellas impresas. Si el animal no salía ni caminaba en línea recta dentro del corredor hasta alcanzar la caja de llegada, se administraba un electrochoque (60 Hz, 6 V) para inducirlo a buscar refugio en la caja de llegada. Siempre que el animal alcanzaba la caja de llegada, ésta se cerraba y permanecía allí durante un minuto antes de devolverlo a su jaula.
- Del cuarto día en adelante, el procedimiento descrito en la fase anterior se repetía hasta que todos los animales alcanzaran la caja de llegada sin necesidad de administrar electrochoques.

El entrenamiento se consideraba completo cuando los animales cruzaban el corredor dos veces seguidas durante cinco días consecutivos sin necesidad de electrochoques.

Una vez que el entrenamiento terminó, se tomó un registro inicial de la impresión de la huella y a 12 ratas se les aplicó la evaluación motora y somatosensorial descrita por García et al [16], que consta de dos valoraciones

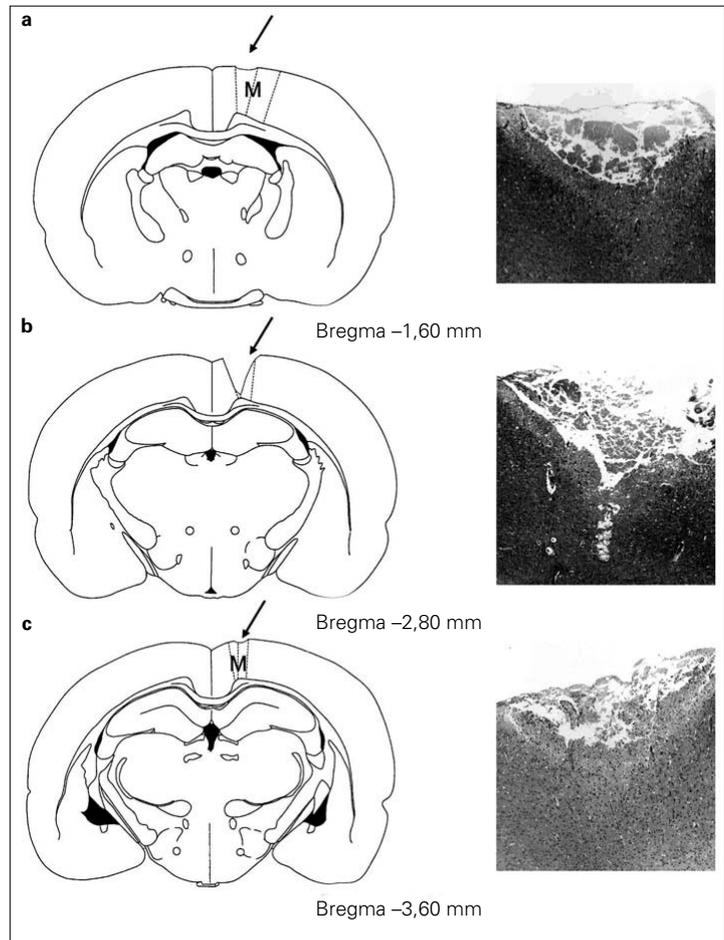


Figura 2. Representación esquemática que muestra la extensión de la lesión (izquierda) y las fotomicrografías (10x) tomadas de cortes equivalentes en una rata tipo (derecha). Se observó que la cavidad está bien delimitada en la corteza motora representativa del miembro posterior izquierdo. En a y en c se muestra también afectado el borde externo de la corteza motora primaria (M), mientras que en b, correspondiente al área más lesionada, se observa que una porción de la corteza somatosensorial también está afectada. Sin embargo, la ausencia de efectos evaluada mediante las pruebas somatosensoriales sugiere que esta lesión no es significativa (tomado de [8], con permiso del editor).

motoras para estimar la simetría del movimiento de los cuatro miembros, cuyo procedimiento consistió en tomar de la cola a la rata y levantarla totalmente para observar la simetría en el movimiento de las cuatro extremidades. Las calificaciones se otorgan de la siguiente manera:

1. Los cuatro miembros se extienden simétricamente.
2. Los miembros de un lado se extienden más o menos lentamente que los del otro lado o se observa una extensión lenta de los cuatro miembros
3. Los miembros de uno u otro lado muestran una cantidad de movimientos muy limitada.
4. Los miembros posteriores de uno o ambos lados no presentan movimientos.

La otra prueba aplicada fue la de agarre, basada en que normalmente la rata se agarra con las cuatro patas cuando se la coloca sobre la tapa de alambre de su caja y ésta es volteada. Las calificaciones se asignan de este modo:

1. La rata se agarra con las cuatro patas.
2. Uno o los dos lados están alterados mientras el animal se agarra, o bien se agarra de manera defectuosa.
3. La rata tiende a caerse de la jaula.

La calificación final de la evaluación motora fue la suma de las puntuaciones obtenidas en cada una de las pruebas mencionadas.

La evaluación somatosensorial se realizó mediante las siguientes pruebas. Para la evaluación de la propiocepción del cuerpo, la rata se tocó con un

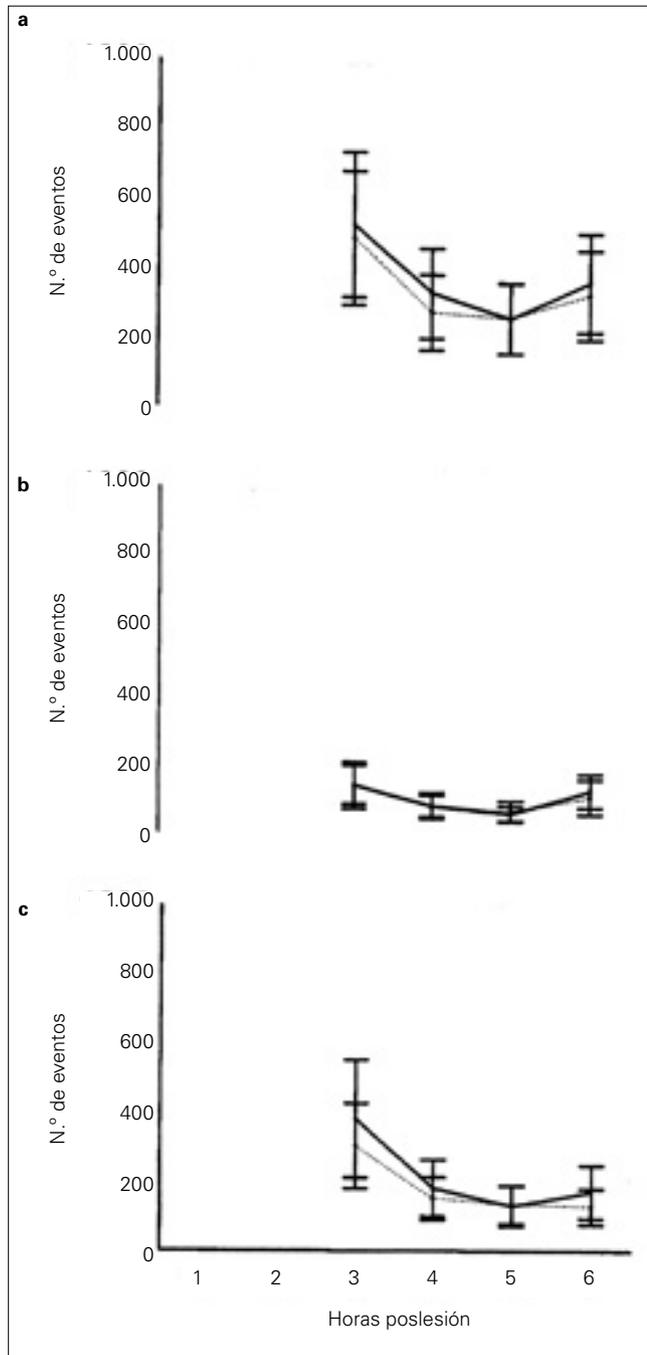


Figura 3. Resultados obtenidos de la actividad motora espontánea divididos en sus tres modalidades. La actividad horizontal (a) evalúa la cantidad de movimientos ambulatorios en el plano horizontal, la actividad vertical (b) es la cantidad de movimientos realizados cuando el animal se levanta y la actividad ambulatoria espontánea (c) se refiere al cambio de posición dentro del cuadrante de la cámara de registro. El análisis *U* de Mann-Whitney no reveló ningún cambio significativo durante las cuatro horas de registro. Las gráficas muestran las medias \pm error estándar de la media. Líneas continuas: grupo de control; líneas punteadas: grupo lesionado.

lápiz en cada costado y se observó la reacción al estímulo. Las calificaciones se asignaron de la siguiente forma:

1. Cuando la rata reacciona volviendo la cabeza hacia el lado donde recibe el estímulo y esta reacción es igual en ambos lados del cuerpo.
2. Cuando la rata reacciona lentamente al estímulo en uno o ambos lados.
3. Cuando la rata no responde al estímulo.

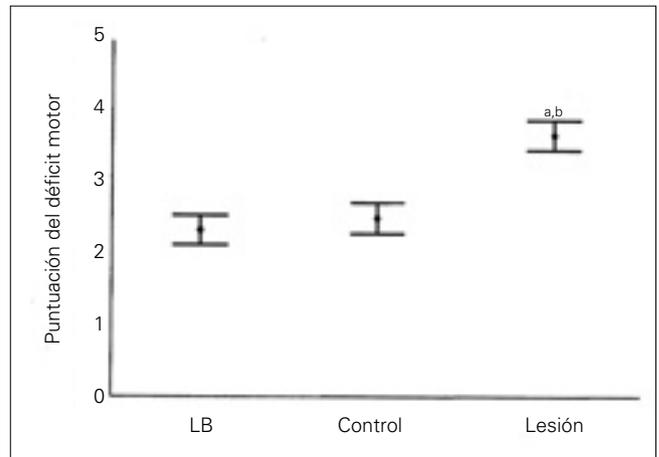


Figura 4. Efectos de la lesión por ablación cortical sobre el déficit motor, donde los animales lesionados mostraron un incremento en sus puntuaciones. Es importante señalar que el déficit de los animales lesionados mostró diferencias significativas comparado tanto con los animales de control como con sus propios registros iniciales (LB). Significativo con respecto al grupo control (^a) o con respecto al registro inicial (^b).

La respuesta al toque de las vibrisas se realizó rozando las vibrisas de cada lado con el lápiz, el cual se aproximó al animal desde la cola hacia delante, para evitar que entrara en su campo visual. Las calificaciones se otorgaron según la siguiente escala:

1. La rata reacciona volviendo la cabeza hacia el lado del estímulo y esta reacción es igual en ambos lados del cuerpo.
2. La rata reacciona lentamente al estímulo independientemente del lado estimulado.
3. La rata no responde al estímulo en uno o en ambos lados.

La calificación final para la evaluación somatosensorial se calculó mediante la suma de calificaciones obtenidas en la propiocepción del cuerpo y en la respuesta al toque de las vibrisas.

Pantoni et al han descrito la validación de estos instrumentos de medición [17]. Inmediatamente después, los animales fueron anestesiados con un cóctel de ketamina-xilazina (100 mg/kg-5 mg/kg) y montados en un aparato estereotáxico (David Kopf) para practicar la cirugía de lesión. El cráneo se expuso por medio de una incisión en el cuero cabelludo y se practicó una trepanación (diámetro de 1 mm, aproximadamente) mediante un taladro dental. Después de cortar las meninges con el bisel de una aguja de jeringa para insulina, se lesionó el hemisferio cerebral derecho de 18 ratas mediante la aspiración del área motora representativa del miembro posterior [18], localizada en las siguientes coordenadas: anteroposterior 2 mm y lateral 2 mm con respecto al bregma. La aspiración se realizó con una pipeta de cristal (diámetro de 1 mm) acoplada a una bomba de vacío (Stoelting 6C) hasta alcanzar los 2 mm de profundidad. Por otro lado, 17 ratas se utilizaron como grupo de control; éstas recibieron el mismo tratamiento quirúrgico que las lesionadas pero sin succionar el tejido cerebral. Finalmente, se suturó el cuero cabelludo con *catgut* n.º 00 y se proporcionaron los cuidados postoperatorios recomendados por González-Piña y Escalante-Membrillo [19].

Con el fin de no agotar físicamente a los animales con un exceso de pruebas conductuales, seis de las ratas de control y seis de las lesionadas se registraron seis horas después de la lesión para la evaluación motora y somatosensorial, además de la medición de la actividad ambulatoria espontánea en un monitor de infrarrojos (Stoelting), de la cual no se tomó un registro inicial debido a que la prueba exige un tiempo de habituación de al menos tres horas antes del registro, razón por la cual las ratas se introdujeron en el dispositivo inmediatamente después de la cirugía y las mediciones se tomaron tres, cuatro, cinco y seis horas después de la lesión. Por otro lado, 11 ratas del grupo de control y 12 del grupo lesionado se utilizaron para el análisis de la impresión de la huella seis horas después de la cirugía.

Finalmente, los animales fueron decapitados y el encéfalo se colocó en una solución de formol (10% v/v) en *buffer* de fosfatos (pH 7,2) con el fin

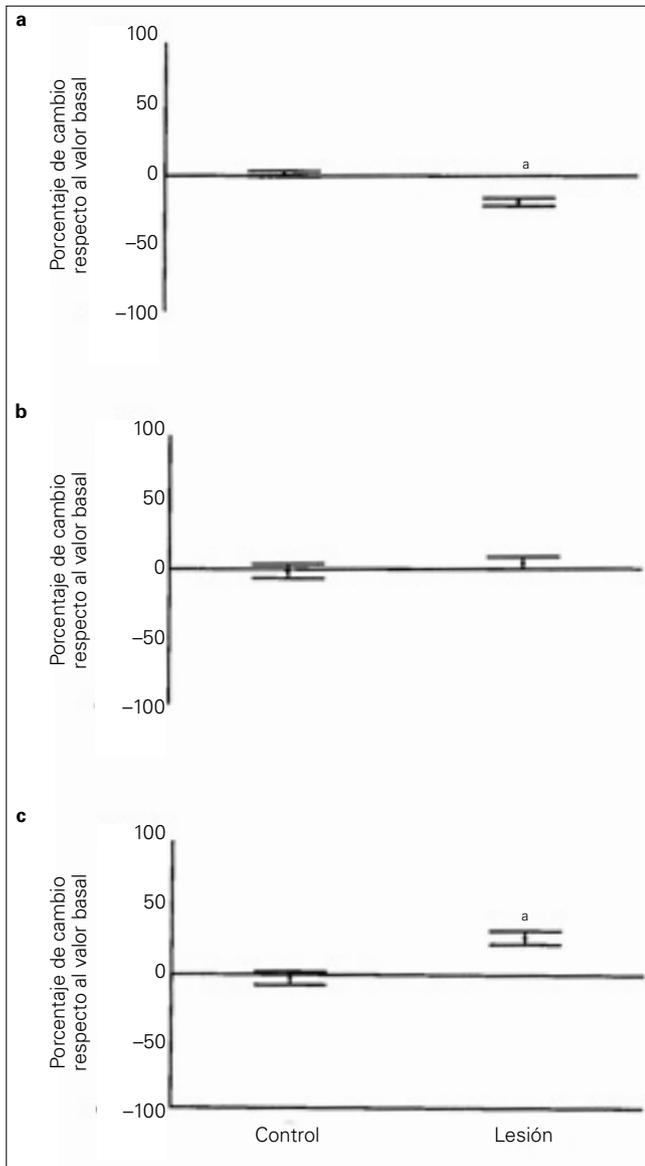


Figura 5. Resultados de longitud (a), anchura (b) y ángulo (c) de la zancada medidos a partir del análisis de la huella impresa. Se encontró que la ablación cortical disminuye notablemente la longitud de la zancada en los animales lesionados, mientras que el ángulo se incrementa. Como se muestra, no hubo modificaciones en la anchura. *U* de Mann-Whitney. ^a $p < 0,01$.

de estimar el tamaño de la lesión mediante la observación de los tejidos por microscopía de luz. La cavidad se contorneó en los esquemas equivalentes al corte coronal tomados del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson [20].

De las evaluaciones somatosensoriales y motoras, las comparaciones de medias se realizaron con la prueba *U* de Mann-Whitney. La longitud y la anchura de la zancada se obtuvieron de la impresión de la huella y, a partir de estas dos mediciones, se calculó el ángulo de la zancada mediante la fórmula: $\text{ángulo} = \arctan(2 \times \text{ancho} \div \text{largo})$. Estas tres variables se transformaron en porcentaje de incremento con respecto al inicio y se analizaron por medio de la prueba *U* de Mann-Whitney. En todos los casos, los niveles de significación se fijaron en $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Las observaciones realizadas por microscopía de luz mostraron que la lesión fue similar en todas las ratas, limitada focalmente en la corteza motora representativa del miembro posterior. La cavidad se extendió desde aproxi-

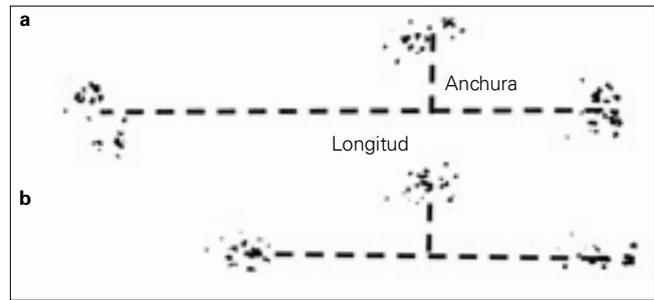


Figura 6. Se muestran un par de zancadas de un animal antes de la lesión (a) y seis horas después de la ablación cortical (b). Las manifestaciones de las secuelas motoras fueron visibles mediante este procedimiento, pues la disminución de la longitud se observa con mucha claridad en este esquema.

madamente 1,6 mm con respecto al bregma; su mayor área se observó entre 2,56 y 2,8 mm y terminó entre 3,14 y 3,6 mm (Fig. 2).

La evaluación somatosensorial no mostró ningún cambio significativo, ya que todas las puntuaciones tuvieron un valor de 2, tanto en el registro inicial como después de la lesión cerebral (datos no mostrados). Asimismo, en el estudio de la actividad motora espontánea tampoco se observaron cambios significativos en ninguna de las tres variables que se miden en este análisis (Fig. 3).

Sin embargo, la evaluación motora mostró un incremento en el déficit motor de los animales lesionados, en comparación con los controles ($p = 0,0035$), con valores de $3,67 \pm 0,21$ y $2,50 \pm 0,22$, respectivamente. Esto fue consistente con el comportamiento estadístico observado cuando las mediciones posquirúrgicas se compararon con sus respectivos valores iniciales. No se encontraron diferencias significativas entre las condiciones iniciales y posquirúrgicas del grupo de control ($p = 0,6109$), pero sí en el grupo de animales lesionados ($p = 0,015$) (Fig. 4).

En el estudio de la impresión de la huella, los cambios significativos entre ambos grupos consistieron en una disminución de la longitud ($-18\% \pm 2,4$; $p = 0,001$) y un incremento en el ángulo de la zancada ($22\% \pm 4,65$; $p = 0,003$), mientras que en la anchura no se encontraron modificaciones importantes (Fig. 5). Los cambios en estas variables fueron claramente visibles en el registro conductual (Fig. 6).

DISCUSIÓN

La consistencia entre los datos obtenidos de la evaluación motora y la impresión de la huella confirma que la medición de las secuelas motoras mediante este método es lo bastante sensible para mostrar el déficit motor ocasionado por la lesión. Esto es importante, considerando que nuestros resultados permiten caracterizar las modificaciones de la conducta motora causadas por el daño cerebral mediante la ablación cortical representativa del movimiento del miembro posterior. En este sentido, la medición del ángulo de la zancada puede ser el parámetro más adecuado para valorar las secuelas de la lesión sobre el desplazamiento, pues se deriva de la interacción de la longitud y el ancho. La observación de que el ángulo se incrementa con el daño cerebral indica que la base de soporte de los animales dañados se altera, lo cual puede deberse a modificaciones en el movimiento del centro de gravedad durante el desplazamiento, cambios que se han descrito también en humanos hemipléjicos como consecuencia de las alteraciones de la marcha [21]. Por otro lado, aunque la evaluación motora realizada en nuestros animales proporciona datos cualitativos, se encontró una concordancia clara con respecto al análisis de la huella impresa, que facilita datos cuantitativos, ya que mostró cambios significativos en los animales con daño cerebral. Considerando que la evaluación

cualitativa califica otras habilidades motoras, se puede concluir que la ablación de la corteza motora es capaz de generar cambios no sólo en el desplazamiento, sino también en la capacidad de agarre y en el reflejo de extensión de los miembros cuando se levanta al animal sujetándolo por la cola. En conjunto, los efectos sobre los parámetros de la huella impresa, la capacidad de agarre o sujeción y el reflejo de extensión de los miembros pueden ser una consecuencia de la flacidez, la cual, junto con alteraciones en los reflejos simpáticos, también se ha reportado en humanos hemipléjicos [22]. Además, el reflejo de la extensión de los miembros es un indicador de la simetría de la función motora, alterada por el daño cerebral. En este sentido, se ha observado que los pacientes hemipléjicos presentan una recuperación simétrica, ya que los movimientos de los miembros superiores se recuperan al mismo tiempo que los de las extremidades inferiores [23].

Según nuestros hallazgos, las características de las secuelas motoras del daño cerebral en las ratas son muy similares a las descritas en humanos hemipléjicos, lo cual sugiere que el modelo de lesión empleado en este trabajo puede ser muy útil en la obtención de información básica referente a la recuperación de funciones perdidas, como ya han afirmado algunos otros autores [7,8,24]. Sin embargo, esta hipótesis presenta algunas limitaciones dignas de consideración, pues es importante resaltar que en este trabajo se halló un efecto nulo sobre la actividad ambulatoria espontánea, lo cual no está documentado en humanos hemipléjicos. Esto no necesariamente significa que los pacientes humanos puedan desarrollar la misma conducta, pues existen diferencias obvias entre el modelo animal y el hombre, entre las cuales destacan las variables relacionadas con los efectos psicológicos de la discapacidad tanto en el paciente [25] como en sus cuidadores [26,27] y otros factores secundarios, como los económicos y los sociales, más complejos que aquellos a los cuales están sometidos los animales. Por otro lado, la ausencia de efectos sobre el sistema somatosensorial, medida con nuestras pruebas previamente validadas por otros autores, no se presenta en el hemipléjico humano, pues desde la década pasada se ha comunicado la pérdida de sensibilidad en estos pacientes, la cual se relaciona incluso con el equilibrio motor [28]. Ésta es la diferencia más importante que el modelo animal presenta con respecto a la hemiplejía en los humanos.

La evaluación de las manifestaciones conductuales del movimiento podría utilizarse para estudiar el papel de las vías relacionadas tanto con la expresión del daño cerebral como con la recuperación funcional. Por ejemplo, hay pruebas de que tanto el paradigma de castigo como el de recompensa inducen el ajuste de la conducta motora mediante diferentes sistemas neurales. En el caso del uso del castigo, se induce el ajuste de la actividad del cíngulo anterior, mientras que con la recompensa se modifica la actividad neuronal en el estriado dorsal [29]. Esto permite suponer que los efectos específicos de estos paradigmas sobre la recuperación funcional podrían tener diferentes manifestaciones conductuales, que pueden medirse con los instrumentos empleados en este trabajo. Ya que estas herramientas son poco costosas, los investigadores están actualmente en condiciones de hacer este tipo de estudios en humanos [30]. Esto se justifica aún más si se considera que se ha planteado la hipótesis de que, como la naturaleza anatómica de las lesiones cerebrales no es enteramente uniforme en el humano, las consecuencias conductuales tampoco lo son [31].

Se requieren más estudios enfocados hacia el análisis motor de las secuelas del daño cerebral que puedan relacionarse con las funciones psicofisiológicas y neuroquímicas, con el fin de conocer los mecanismos básicos subyacentes a la recuperación funcional que puedan ser útiles en el futuro para la rehabilitación de las secuelas motoras e incluso de las psicológicas derivadas de la discapacidad [32]. Esto deberá realizarse con un enfoque multidisciplinario, pues la marcha es una de las actividades humanas más universales y complejas, cuyo sustrato está regido por vías y redes neurales pertenecientes a diversas regiones, que van desde la corteza cerebral hasta los músculos [33], de modo que es el resultado de la actividad integradora del sistema nervioso central, cuya alteración impacta sobre la calidad de vida física y mental.

En conclusión, el modelo animal de daño cerebral producido por ablación cortical se caracteriza por tener secuelas muy semejantes a las de la hemiplejía en los humanos, por lo que es un buen paradigma para estudiar los mecanismos básicos de la recuperación funcional en el ámbito motor, aunque no en el somatosensorial, ya que las manifestaciones conductuales en las ratas se observaron sólo sobre el movimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Farreras-Valenti P, Rozman C. Medicina interna. 1 ed. México: Marín; 1976.
- Noback CR, Demarest RJ. Sistema nervioso humano. Fundamentos de neurobiología. 1 ed. México: McGraw-Hill; 1980.
- Mark H, Beers MH, Fletcher AJ. Nuevo manual Merck de información médica general. 2 ed. Barcelona: Océano; 2006.
- Carroll D. The disability in hemiplegia caused by cerebrovascular disease: serial studies of 98 cases. *J Chronic Dis* 1962; 15: 179-88.
- Fleming JF, Petrie D. Traumatic thrombosis of the internal carotid artery with delayed hemiplegia. *Can J Surg* 1968; 11: 166-72.
- Söderback I, Ekholm J, Caneman G. Impairment/function and disability/activity 3 years after cerebrovascular incident or brain trauma: a rehabilitation and occupational therapy view. *Int Disabil Stud* 1991; 13: 67-73.
- González-Piña R, Bueno-Nava A, Montes S, Alfaro-Rodríguez A, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, et al. Pontine norepinephrine content after motor cortical ablation in rats. *Proc West Pharmacol Soc* 2005; 48: 73-6.
- González-Piña R, Bueno-Nava A, Montes S, Alfaro-Rodríguez A, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, et al. Pontine and cerebellar norepinephrine content in adult rats recovering from focal cortical injury. *Neurochem Res* 2006; 31: 1443-9.
- Brailowsky S, Knight RT, Blood K, Scabini D. Gamma-aminobutyric acid-induced potentiation of cortical hemiplegia. *Brain Res* 1986; 362: 322-30.
- Katz DI, White DK, Alexander MP, Klein RB. Recovery of ambulation after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2004; 85: 865-9.
- Koyama T, Matsumoto K, Okuno T, Domen K. A new method for predicting functional recovery of stroke patients with hemiplegia: logarithmic modelling. *Clin Rehabil* 2005; 19: 779-89.
- Feeny DM, De Smet AM, Rai S. Noradrenergic modulation of hemiplegia: facilitation and maintenance of recovery. *Restor Neurol Neurosci* 2004; 22: 175-90.
- Goldstein LB. Effects of amphetamines and small related molecules on recovery after stroke in animals and man. *Neuropharmacology* 2000; 39: 852-9.
- Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide for the care and use of experimental animals. *Can Council Animal Care* 1993; 1: 211.
- Festing MFW. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab Anim Sci* 1994; 28: 212-21.
- García JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995; 26: 627-35.
- Pantoni L, Bartolini L, Pracucci G, Inzitari D. Interrater agreement on a simple neurological score in rats. *Stroke* 1998; 29: 871-2.

18. Hall RD, Lindholm EP. Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Res* 1974; 66: 23-38.
19. González-Piña R, Escalante-Membrillo C. Algunas consideraciones bio-éticas en los estudios de sueño simultáneos al muestreo neuroquímico en animales con libertad de movimientos. *Animales de Experimentación* 2000; 6: 26-32.
20. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Bowen Hills: Australian Academic Press; 1982.
21. Nutt JG, Marsden CD, Thompson PD. Human walking and higher-level gait disorders, particularly in the elderly. *Neurology* 1993; 43: 268-79.
22. Gokkaya NK, Aras M, Yesiltepe E, Koseoglu F. Reflex sympathetic dystrophy in hemiplegia. *Int J Rehabil Res* 2006; 29: 275-9.
23. Duncan PW, Goldstein LB, Horner RD, Landsman PB, Samsa GP, Matchar DB. Similar motor recovery of upper and lower extremities after stroke. *Stroke* 1994; 25: 1181-8.
24. Zepeda A, Montiel T, Brailowsky S. Functional recovery from cortical hemiplegia in the rat: effects of a callosotomy. *J Neurotrauma* 1999; 16: 267-71.
25. Ubel PA, Loewenstein G, Jepson C. Disability and sunshine: can hedonic predictions be improved by drawing attention to focusing illusions or emotional adaptation? *J Exp Psychol Appl* 2005; 11: 111-23.
26. Ray RA, Street AF. Non-finite loss and emotional labour: family caregivers' experiences of living with motor neurone disease. *J Clin Nurs* 2007; 16: 35-43.
27. Raina P, O'Donnell M, Rosenbaum P, Brehaut J, Walter SD, Russell D, et al. The health and well-being of caregivers of children with cerebral palsy. *Pediatrics* 2005; 115: e626-36.
28. Di Fabio RP, Badke MB. Relationship of sensory organization to balance function in patients with hemiplegia. *Phys Ther* 1990; 70: 542-8.
29. Wrase J, Kahnt T, Schlagenhauf F, Beck A, Cohen MX, Knutson B, et al. Different neural systems adjust motor behavior in response to reward and punishment. *Neuroimage* 2007; 36: 1253-62.
30. Pomeroy VM, Chambers SH, Giakas G, Bland M. Reliability of measurement of tempo-spatial parameters of gait after stroke using GaitMat II. *Clin Rehabil* 2004; 18: 222-7.
31. Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. *Exp Neurol* 1992; 116: 40-51.
32. Ríos-Romenets S, Castaño-Monsalve B, Bernabeu-Guitart M. Farmacoterapia de las secuelas cognitivas secundarias a traumatismo craneo-encefálico. *Rev Neurol* 2007; 45: 563-70.
33. Joffeir EJ. Gait disturbance. *Austr Family Physicians* 1992; 21: 1437-40.

EVALUATION OF THE MOTOR BEHAVIOR IN RATS WITH CORTICAL ABLATION

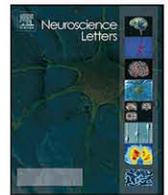
Summary. Introduction. *The cortical ablation has been used as an experimental model in order to study the basic mechanisms of functional recovery. However, there is not data concerning to the injury effects on the motor and somatosensorial behavioral manifestations that allow us to categorize such sequels as a hemiplegic model.* Materials and methods. *We used 35 male Wistar rats (280-300 g) allocated in two groups: control (n = 17) and brain injured by cortical ablation (n = 18). Previously trained, basal recordings of the footprint and motor and somatosensorial assessment were performed in the rats before surgery. The behavioral tests were performed again 6 hours after surgery and the spontaneous ambulatory activity was also evaluated.* Results and conclusions. *It was observed a decrease in the stride's length and an increase in the stride's angle and in the motor deficit, while the somatosensorial assessment and spontaneous ambulatory activity were not affected. These findings are discussed in function of the motor features of the hemiparetic sequels in humans. [REV NEUROL 2008; 47: 304-9]*

Key words. Brain injury. Hemiplegia. Motor behavior. Movement. Rats.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Reversal of noradrenergic depletion and lipid peroxidation in the pons after brain injury correlates with motor function recovery in rats

Antonio Bueno-Nava^e, Sergio Montes^b, Paloma DelaGarza-Montano^a, Alfonso Alfaro-Rodriguez^c, Ascencion Ortiz^d, Rigoberto Gonzalez-Pina^{a,*}

^a Laboratorio de Neuroplasticidad, Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA, Calz. Mexico-Xochimilco 289 Col. Arenal de Guadalupe Deleg. Tlalpan, C.P. 14389 Mexico City, Mexico

^b Depto. de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, SSA, Mexico

^c Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA, Mexico

^d Subdirección de Investigación Tecnológica, Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA, Mexico

^e Laboratorio de Cromatografía y Microdialisis, Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2008

Received in revised form 13 June 2008

Accepted 18 July 2008

Keywords:

Brain injury
Cerebellum
Diaschisis
Functional recovery
Lipid peroxidation
Noradrenaline
Pons

ABSTRACT

Functional impairment after brain injury (BI) has been attributed to the inhibition of regions that are related to the injured site. Therefore, noradrenaline (NA) is thought to play a critical role in recovery from motor injury. However, the mechanism of this recovery process has not been completely elucidated. Moreover, the locus coeruleus (LC) projects from the pons through the rat sensorimotor cortex, and injury axotomizes LC fibers, depressing NA function. This was tested by measuring lipid peroxidation (LP) in the pons after sensorimotor cortex injury. Depression of function in the pons would be expected to alter areas receiving pontine efferents. Male Wistar rats were divided into three groups: control ($n = 16$), injured ($n = 10$) and recovering ($n = 16$), and they were evaluated using a beam-walking assay between 2 and 20 days after cortical injury. We performed measures of NA and LP in both sides of the pons and cerebellum. We found a decrease of NA in the pons and the cerebellum, and a concomitant increase in the motor deficit and LP in the pons of injured animals. Recovering rats had NA and LP levels that were very similar to those observed in control rats. These observations suggest that the mechanism of remote inhibition after BI involves lipid peroxidation, and that the NA decrease found in the cerebellum of injured animals is mediated by a noradrenergic depression in the pons, or in areas receiving NA projections from the pons.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

It has been proposed that functional impairment after brain injury (BI) is caused by an inhibition of parts of the brain that are remote from, but anatomically related to the region of the injury [10]. This remote inhibition is known as diaschisis [7,33]. It is possible that functional recovery could result from a restoration of the basal conditions that were present prior to the injury. Noradrenaline (NA) has been shown to have an important role in this recovery: intravenous infusions of NA ameliorate the motor impairment observed after cortical BI in rats [3], and cerebellar NA infusions accelerate brain recovery [4]. Microdialysis studies have also shown that NA bilaterally decreases in the cerebellum after BI [21], and pharmacological studies have demonstrated that the NA agonist/antagonist

nature of an administered substance can either have beneficial or deleterious effects on functional recovery [8,9,12,14]. A biochemical diaschisis after BI in the cerebellum of rats has previously been proposed to exist, as indicated by an increase in lipid peroxidation (LP) [29]. In this context, it is notable that the motor cortex is anatomically connected to the locus coeruleus (LC), which is the main noradrenergic reservoir of the central nervous system [1], and is contained in the pons. It is also known that the pontine NA neurons project to the cerebellum [30]. Therefore, it may be expected that noradrenergic depression at the pontine level could result from an increase in LP after cortical BI, and that restoration of the biochemical conditions that was present before BI would be associated with functional recovery. Our aim was to study the noradrenergic-specific pontine mechanisms involved in brain recovery by measuring the total pontine NA content and LP in motor-impaired and recovering rats.

Forty-two male Wistar rats (290–320 g) were used. The animals were provided by the vivarium of the Instituto Nacional de Rehabilitación. The rats were fed with Purina rodent laboratory chow and maintained on a 12-h/12-h light/darkness schedule. Rats were

* Corresponding author at: Laboratorio de Neuroplasticidad, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Rehabilitación, Calz. Mexico-Xochimilco 289 Col. Arenal de Guadalupe Deleg. Tlalpan, C.P. 14389 Mexico City, Mexico.
Tel.: +52 55 59 99 10 00x19201/19214.

E-mail addresses: higgo65@salud.gob.mx, higgo@prodigy.net.mx (R. Gonzalez-Pina).

adapted to the laboratory conditions at least 1 week prior to surgery. During this time, they were handled daily in order to accustom them to the experimental manipulations. Rats were treated according to the Guide for the Care and Use of Experimental Animals [26].

The animals were anesthetized according to the methods described by Gonzalez-Pina et al. [15] and were mounted in a stereotaxic frame (David Kopf). A cannula made with a stainless-steel syringe needle without its beveled edge (no. 18 bore) was placed on the meninges over the motor cortical representation of the hind limb [17] and fixed with dental acrylic. The wounds were sutured with catgut 00, and a topical healer (furazolidone) was sprayed over the scar. An antibiotic treatment (tylocin, 10 mg/kg i.m.) was administered for 3 days. Rats were maintained under veterinary supervision for 8 days after surgery, and then randomly assigned into three groups: control ($n=16$), injured ($n=10$) and recovering ($n=16$). The first group received an intraparenchymal injection of artificial cerebrospinal fluid (CSF, 10 μ l) in free-moving conditions. Motor deficits were evaluated after 20 days of observation. The second group received 10 μ l of CSF containing FeCl₂, and this group was decapitated 2 days after injury. The third group received the same treatment as the second group, and the motor deficits resulting from the cortical injury were evaluated after 20 days. Lesions were induced by the intracortical injection of FeCl₂ (50 mM), which was dissolved in CSF containing (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1.3 CaCl₂, 1 MgCl₂ and 2.3 NaHCO₃, pH 7.2. The microinjection of iron into the cortex was performed in order to mimic a cortical injury reminiscent of a subarachnoid hemorrhage. After injection, animals were decapitated at different times (2 and 20 days) to determine the NA concentration and LP. Fluids were administered by inserting a syringe needle through the cannula, which was inserted to a depth of 1 mm into the cortical parenchyma. This needle was connected to a Hamilton syringe (1 ml) with a hose (0.6-mm i.d., PEEK tubing, BAS) which was placed on a microinjection pump, which was calibrated to a flow rate of 1 μ l/min.

After 24 h, motor deficits were evaluated using the beam-walking test described in Brailowsky et al. [5]. Measurements were made every 24 h for 20 days, and then the rats were sacrificed. Animals were decapitated between 18:00 h and 19:00 h to eliminate variations in NA that are due to circadian rhythms. The brains were extracted and placed on a cool plate to isolate the pons and cerebellum, which were divided into their respective right and left sides. Eight rats from the control, five from the injured, and eight from the recovering groups were used for the NA analysis, and the same number of animals from each group was used for the LP analysis. The NA content was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection, according to the method described by Gonzalez-Pina et al. [15].

Lipid peroxidation was estimated by measuring the formation of lipid fluorescent products (LFP), using the technique described by Triggs and Willmore [32], as modified by Santamaria and Rios [28].

The encephalus was placed in a 10% formalin/buffer solution to delineate the lesion using Kluver-Barrera stain, and photomicrographs were obtained.

The results of the beam-walking test were analyzed with a non-correlated Mann–Whitney *U*-test, while statistical analysis of the NA and LP measurements was performed with a one-way ANOVA and a post hoc Tukey test. In addition, correlation coefficients were only estimated for control and recovering groups, before and after that the injury was performed. In all cases, the significance levels were set to $P \leq 0.05$.

When the brain slices were observed by light microscopy, the tracks of the needle through which FeCl₂ was administered were located in the motor cortex at a depth of approximately 1 mm (Fig. 1).

The scores obtained from the beam-walking test were significantly higher in the recovering group than in the control group at days 1 ($P=0.0023$), 2 ($P=0.0001$), 3 ($P=0.0009$), 4 ($P=0.0010$), 5 ($P=0.0001$), 6 ($P=0.0126$), 7 ($P=0.0450$), 8 ($P=0.0014$) and 9

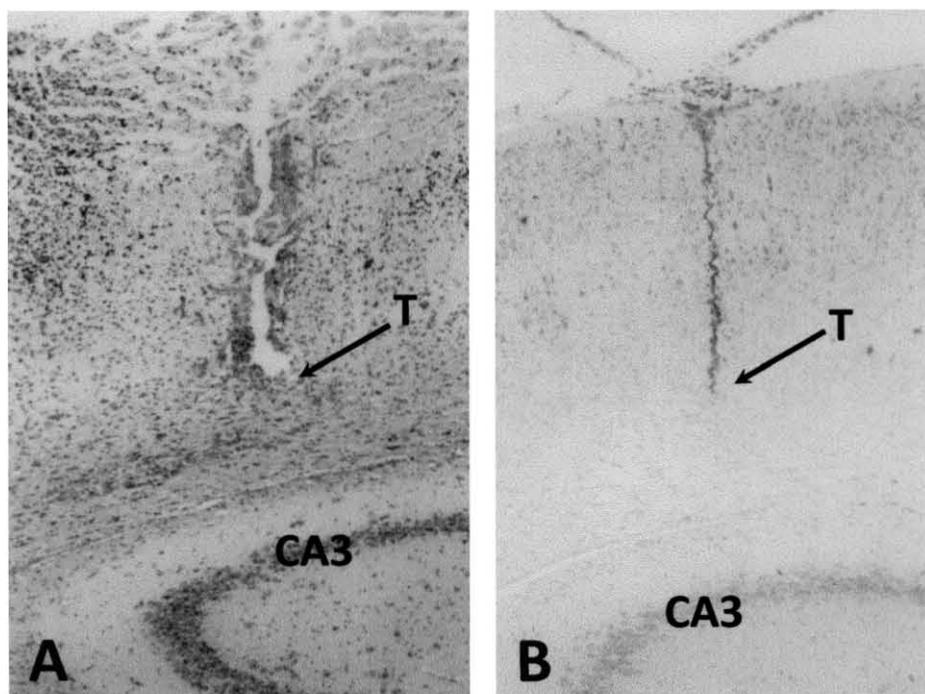


Fig. 1. Photomicrograph showing the microinjection site in the cortex of two different animals. (A) Representative slide of an injured rat at 2 days post-injection. (B) Representative slide of a recovered rat at 20 days post-injection. The guide-cannula tip was inserted into the sensorimotor cortex parenchyma in all of the slides. Nissl stain (10 \times). CA3 field: CA3 of hippocampus, T: tip of the guide-cannula. The scale bar in the upper left hand corner represents 500 μ m.

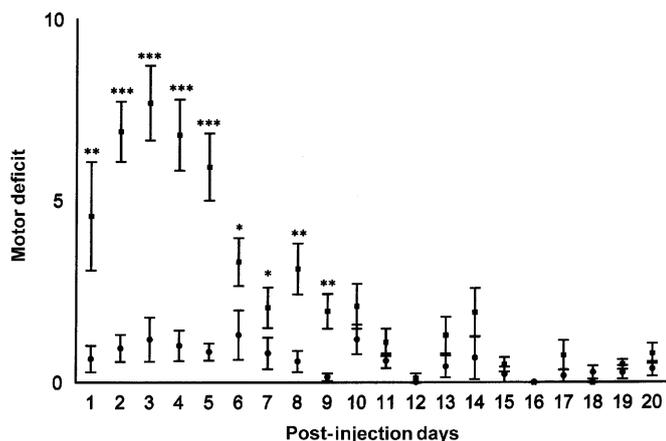


Fig. 2. Scores obtained from the beam-walking test in control (filled circles) and recovered rats (filled squares). The motor deficit increased from the 1st day after injury in recovered rats, and recovery was achieved on the 10th day. This recovery was sustained for the next 10 days. Comparisons were performed using a Mann–Whitney *U*-test (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, and *** $P \leq 0.001$).

($P = 0.0019$). The recovering group had recovered by day 10, and this recovery was sustained for the next 10 days (Fig. 2).

The LP levels on both sides of the pons were higher in the injured group than in the control and recovering groups (right

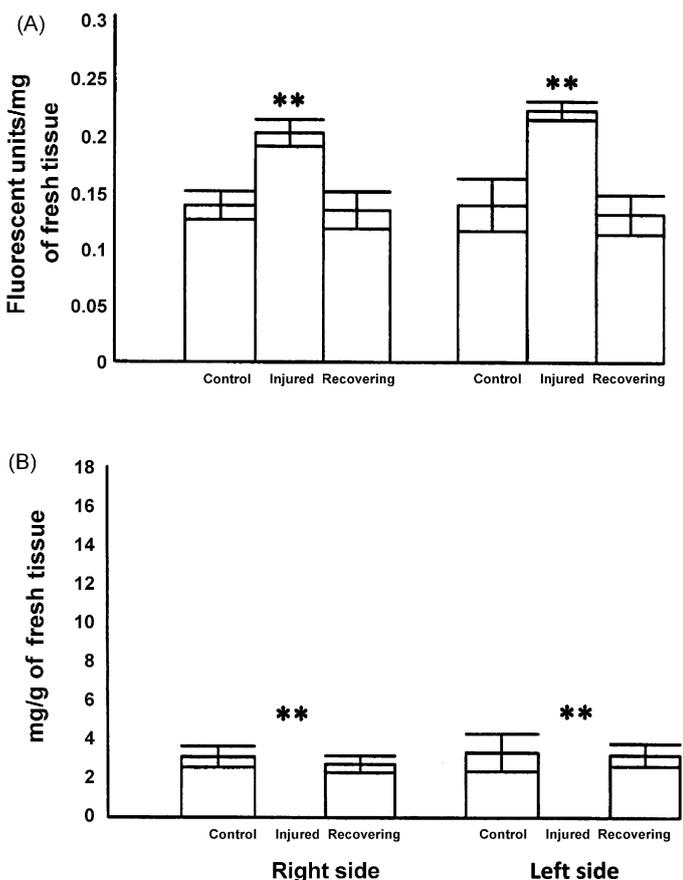


Fig. 3. Pontine lipid fluorescent products (LFP) and noradrenaline (NA) content. (A) The LFP were significantly increased on both sides of the pons in rats at 2 days post-injection of FeCl_2 ; no significant changes were observed in rats at 20 days post-injection. (B) A dramatic decrease in NA on both sides of the pons was observed in injured rats at two days post-injection of FeCl_2 (injured), while NA levels were similar in controls and 20 days post-injection of FeCl_2 (recovering) (post hoc Tukey ** $P \leq 0.01$).

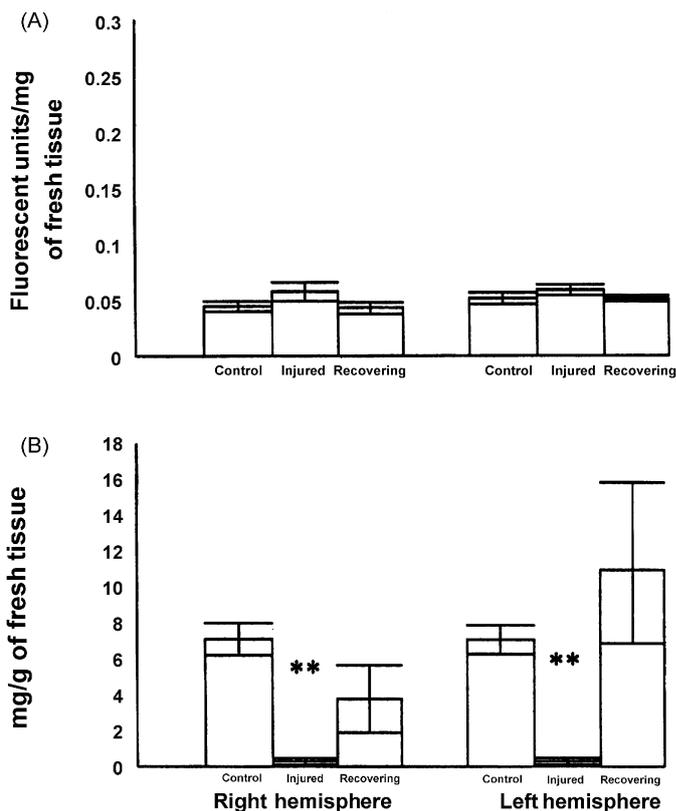


Fig. 4. Cerebellar lipid fluorescent products and noradrenaline (NA) content. (A) No changes in LFP were found in either cerebellar hemisphere. (B) A decrease of NA in both cerebellar hemispheres was observed in injured rats at 2 days post-injection of FeCl_2 (injured), while there were no significant differences in the NA levels between the controls and recovering rats 20 days post-injection of FeCl_2 (post hoc Tukey ** $P \leq 0.01$).

side $F_{2,14} = 5.18$, $P = 0.0207$; left side $F_{2,14} = 5.47$, $P = 0.0176$), while the pontine NA content was drastically reduced to undetectable levels on both sides of the pons in rats from the injured group (right side $F_{2,18} = 11.21$, $P = 0.0007$; left side $F_{2,18} = 5.24$, $P = 0.0161$; Fig. 3).

While no changes were observed in the cerebellar LP, the NA content was significantly lower in injured rats and the levels in recovering rats were not significantly different from the control group (right side $F_{2,18} = 10.20$, $P = 0.0005$; left side $F_{2,18} = 6.12$, $P = 0.0182$; Fig. 4).

The correlation analysis revealed a negative correlation between motor deficit and the NA content of the right ($r = -0.78$; $n = 8$; $P = 0.023$) and left ($r = -0.95$; $n = 7$; $P = 0.001$) sides of the pons in recovering rats (Fig. 5). In contrast, the NA content in the cerebellum did not show a significant correlation with the motor deficit (data not shown). Furthermore, no correlation was found between the motor deficit and the LP of the cerebellum and pons (in either recovering or control rats), or between the motor deficit and the NA content in the cerebellum and pons of the control group (data not shown).

There are a variety of LP generators in the brain, such as copper [2], zinc [11], ozone [6] and iron [18]. It has been previously suggested that oxidative injury of synapses could alter neurotransmitter transport, producing disruptions in the central nervous system (CNS) [27]. An intraparenchymal injection of FeCl_2 induces a systematic change in gene expression, even at remote sites of the brain [20]. There are some lines of evidence that suggest that ferric iron such as FeCl_2 , rather than ferrous iron, can enhance LP [24]. Our results show that LP increases in the pons 48 h after administration of FeCl_2 in the motor cortex (MC). We propose that the LP in

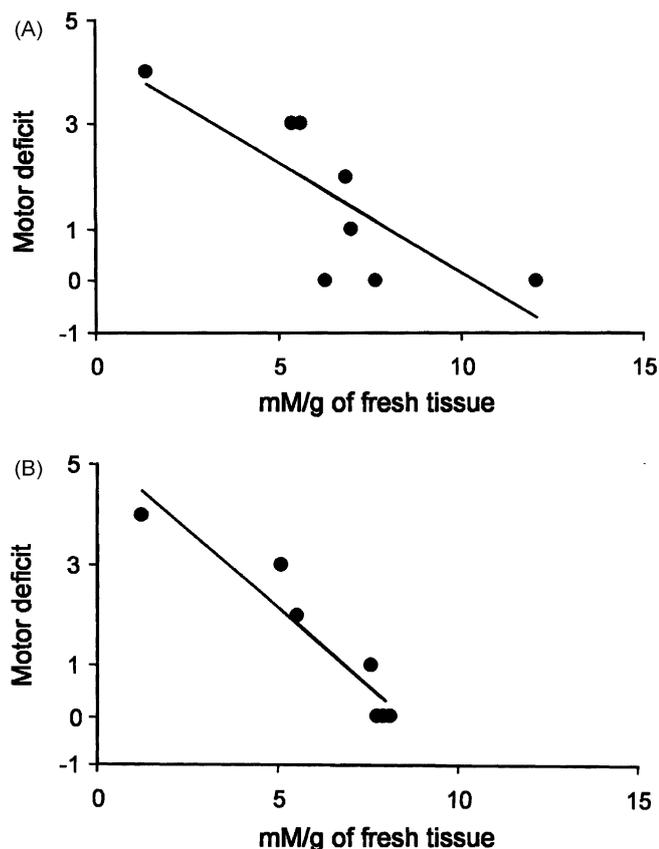


Fig. 5. Relationships between pontine noradrenaline (NA) content and motor deficits in recovering rats. Both figures showed an inverse correlation between pontine NA content and motor deficits in the right (A) and left (B) sides of the pons. These results showed that while there was a decrease in the motor deficit, there was an increase in the NA content in the pons. Correlation coefficients were calculated using the Pearson product moment correlation ($P < 0.05$).

pons is a direct consequence of the LP produced in the MC, since the superoxide (O_2^-) free radical generated can spread from the site of its formation to other remote sites, and lead to neuronal disruption [19,25,35].

Oxidative stress may be responsible for the dramatic depletion of NA observed in the pons of injured rats. There are anatomical relationships between the MC and the pons [34]. The locus coeruleus, the main noradrenergic reservoir of the CNS [1], is located in the pons. It is possible that the LP that occurs in the MC leads to damage of the LC axon projection from the pons. This damage would affect the soma by retrograde degeneration and shift the LC neurons from production of NA to production of structural proteins, in order to re-build the death terminals. We found that NA depletion is also reflected in the cerebellum, although in the absence of LP. A decrease in the NA content of the cerebellum after BI has been previously reported [16,22], suggesting that this effect is mediated by disruptions in the pons, since well-established anatomical relationships have also been reported [30]. These observations all coincide with an increased motor deficit, which returns to normal 20 days after injury. These conclusions were supported by the inverse correlation between motor deficit scores and NA contents in both sides of the pons in recovering rats. The LP and the NA content in the cerebellum and pons are similar in control and recovering animals. It is possible that some damage persists in the MC, since histological observations showed that introduction of the needle led to trauma, however, the functions of the pons and the cerebellum appeared to be restored, and this correlated with the

recovery of function. We observed a remote depression or diaschisis after $FeCl_2$ -induced injury in the MC that affected both sides of the pons and cerebellum. Diaschisis has been used to explain the behavioral effects of a cerebral injury [29,31]. Although it has been described in zones adjacent to the injury site and also in the cerebellum [23] and pons [15], the mechanisms involved are poorly understood. Our results suggest that such mechanisms could be mediated by the oxidative stress that is produced after injury, and in the case of the MC injury, the cerebellar effects could be explained by a pontine depression.

There is no definitive pharmacological strategy for treatment of humans after stroke, but the use of amphetamines has the same effect on experimental animals and humans [13], suggesting that the mechanism of action is similar in these organisms. Antioxidants and substances that enhance NA activity may possibly be used in human patients to prevent the effects of injury. However, further studies will be necessary to elucidate the mechanisms that lead to recovery, and to develop pharmacological therapies that enhance the benefits of rehabilitation for hemiplegic and aphasic patients.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Camilo Rios-Castañeda for his support with the HPLC analysis and Dr. Fructuoso Ayala-Guerrero for his academic support.

References

- [1] G. Aston-Jones, J. Rajkowski, J. Cohen, Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention, *Prog. Brain Res.* 126 (2000) 165–182.
- [2] A. Becaria, D.K. Lahiri, S.C. Bondy, D. Chen, A. Hamadeh, H. Li, R. Taylor, A. Campbell, Aluminum and copper in drinking water enhance inflammatory or oxidative events specifically in the brain, *J. Neuroimmunol.* 176 (2006) 16–23.
- [3] M.G. Boyeson, D.M. Feeney, Intraventricular norepinephrine facilitates motor recovery following sensorimotor cortex injury, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35 (1990) 497–501.
- [4] M.G. Boyeson, K.A. Krobert, Cerebellar norepinephrine infusions facilitate recovery after sensorimotor cortex injury, *Brain Res. Bull.* 29 (1992) 435–439.
- [5] S. Brailowsky, R.T. Knight, K. Blood, D. Scabini, Gamma-aminobutyric acid-induced potentiation of cortical hemiplegia, *Brain Res.* 362 (1986) 322–330.
- [6] C. Escalante-Membrillo, A. Gonzalez-Maciél, R. Reynoso-Robles, R. Gonzalez-Pina, Brain thiobarbituric acid-reactive substances in rats after short periods of ozone exposure, *Environ. Res.* 99 (2005) 68–71.
- [7] D.M. Feeney, J.C. Baron, Diaschisis, *Stroke* 17 (1986) 817–830.
- [8] D.M. Feeney, R.L. Sutton, Catecholamines and recovery of function after brain damage, in: D.G. Stein, B.A. Sabel (Eds.), *Pharmacological Approaches to The Treatment of Brain and Spinal Cord Injury*, Plenum Publishing Corporation, New York, 1988, pp. 121–142.
- [9] D.M. Feeney, V.S. Westerberg, Norepinephrine and brain damage: alpha-noradrenergic pharmacology alters functional recovery after cortical trauma, *Can. J. Psychol.* 44 (1990) 233–252.
- [10] S. Finger, D.G. Stein, *Brain Damage and Recovery: Research and Clinical Perspectives*, Academic Press, New York, 1982.
- [11] V. Frazzini, E. Rockabrand, E. Mochegiani, S.L. Sensi, Oxidative stress and brain aging: is zinc the link? *Biogerontology* 7 (2006) 307–314.
- [12] L.B. Goldstein, Amphetamine-facilitated functional recovery after stroke, in: M.D. Gisberg, W.D. Dietrich (Eds.), *Cerebrovascular Diseases. Sixteenth Research (Princeton) Conference*, Raven Press, New York, 1989, pp. 303–308.
- [13] L.B. Goldstein, Effects of amphetamines and small related molecules on recovery after stroke in animals and man, *Neuropharmacology* 39 (2000) 852–859.
- [14] L.B. Goldstein, J.N. Davis, Clonidine impairs recovery of beam-walking after a sensorimotor cortex lesion in rats, *Brain Res.* 508 (1990) 305–309.
- [15] R. Gonzalez-Pina, A. Bueno-Nava, S. Montes, A. Alfaro-Rodríguez, A. Gonzalez-Maciél, R. Reynoso-Robles, F. Ayala Guerrero, Pontine and cerebellar norepinephrine content in adult rats recovering from focal cortical injury, *Neurochem. Res.* 31 (2006) 1443–1449.
- [16] R. Gonzalez-Piña, A. Bueno-Nava, C. Escalante-Membrillo, S. Montes, A. Gonzalez-Maciél, F. Ayala-Guerrero, Cerebellar and pontine norepinephrine contents after motor recovery in rats, *Res. Neurol. Neurosci.* 21 (2003) 219–220.
- [17] R.D. Hall, E.P. Lindholm, Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat, *Brain Res.* 66 (1974) 23–38.
- [18] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals, *J. Neurochem.* 69 (1997) 1330–1331.

- [19] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.* 219 (1984) 1–14.
- [20] M. Hironishi, E. Ueyama, E. Senba, Systematic expression of immediate early genes and intensive astrocyte activation induced by intrastriatal ferrous iron injection, *Brain Res.* 828 (1999) 145–153.
- [21] K.A. Krobert, R.L. Sutton, D.M. Feeney, Spontaneous and amphetamine-evoked release of cerebellar noradrenaline after sensorimotor cortex contusion: an in vivo microdialysis study in the awake rat, *J. Neurochem.* 62 (1994) 2233–2240.
- [22] K.A. Krobert, R.L. Sutton, D.M. Feeney, Spontaneous and amphetamine evoked release of cerebellar noradrenaline after sensorimotor cortex contusion: an in vivo microdialysis study in the awake rat, *J. Neurochem.* 62 (1994) 2233–2340.
- [23] B.E. Levin, K.L. Brown, G. Pawar, A. Dunn-Meynell, Widespread and lateralization effects of acute traumatic brain injury on norepinephrine turnover in the rat brain, *Brain Res.* 674 (1995) 307–313.
- [24] D.S. Maharaj, J.L. Limson, S. Daya, 6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation, *Life Sci.* 72 (2003) 1367–1375.
- [25] T. Obata, Role of hydroxyl radical formation in neurotoxicity as revealed by in vivo free radical trapping, *Toxicol. Lett.* 132 (2002) 83–93.
- [26] E.D. Olfert, B.M. Cross, A.A. McWilliam, Guide for the care and use of experimental animals, *Can. Council Anim. Care* (1993) 1–211.
- [27] U. Rafalowska, G.J. Liu, R.A. Floyd, Peroxidation induced changes in synaptosomal transport of dopamine and gamma-aminobutyric acid, *Free Radic. Biol. Med.* 6 (1989) 485–492.
- [28] A. Santamaría, C. Ríos, MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum, *Neurosci. Lett.* 159 (1993) 51–54.
- [29] M. Serteser, T. Ozben, S. Gümüşlü, E. Balkan, Biochemical evidence of crossed cerebellar diaschisis in terms of nitric oxide indicators and lipid peroxidation products in rats during focal cerebral ischemia, *Acta Neurol. Scand.* 103 (2001) 43–48.
- [30] D.A. Steindler, Locus coeruleus neurons have axons that branch to the forebrain and cerebellum, *Brain Res.* 223 (1981) 367–373.
- [31] S. Thomas, M.L. Prins, M. Samii, D.A. Hovda, Cerebral metabolic response to traumatic brain injury sustained early in development: a 2-deoxy-D-glucose autoradiographic study, *J. Neurotrauma* 17 (2000) 649–665.
- [32] W.J. Triggs, L.J. Willmore, In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection, *J. Neurochem.* 42 (1984) 976–980.
- [33] C. Von Monakow, Diaschisis, the localization in the cerebrum and functional impairment by cortical loci, in: K. Pribram (Ed.), *Brain Behavior*, Penguin Books, Baltimore, 1969, pp. 27–36.
- [34] B.D. Waterhouse, C.S. Lin, R.A. Burne, D.J. Woodward, The distribution of neocortical projection neurons in the locus coeruleus, *J. Comp. Neurol.* 217 (1983) 418–431.
- [35] T. Yamasoba, J. Schacht, F. Shoji, J.M. Miller, Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor *in vivo*, *Brain Res.* 815 (1999) 317–325.

Respuesta noradrenérgica diferencial ante las lesiones agudas y crónicas en la corteza motora de la rata

Rigoberto González-Piña,^{*1}
Antonio Bueno-Nava,[†]
Alfredo Durand-Rivera,[‡]
Jocelyn Mancera-Gervasio,^{*}
Alfonso Alfaro-Rodríguez,[§]
Rebeca Jimeno-Papova^{||}

Resumen

Se ha discutido que tanto las lesiones cerebrales agudas como las crónicas involucran diferentes patrones de reorganización. En este trabajo se evaluaron los efectos de una lesión aguda (ablación cortical) y una lesión crónica inducida con cloruro ferroso (FeCl_2) mediante la medición del contenido total de noradrenalina (NA) a nivel pontino y cerebelar, ya que este neurotransmisor ha sido involucrado en la recuperación funcional.

Se utilizaron 66 ratas macho Wistar (280-320 g) distribuidas en seis grupos: Sham A (SA), Sham B (SB) lesionadas por ablación cortical (AC), recuperadas después de la ablación cortical (RAC), lesionadas por inyección intraparenquimal de FeCl_2 dentro de la corteza motora (Fe) y recuperadas después de la lesión por Fe (RFe). Después de un registro basal de la marcha, las ratas AC (N = 6) y RAC (n = 12) fueron lesionadas por ablación de la corteza motora (MCx), mientras que al grupo SA (n = 11) se le dejó intacta. Posteriormente la marcha se registró cada 6 h durante 48 h. A los animales restantes se les fijó una cánula dirigida a la MCx y al grupo SB (n = 16) se le inyectó líquido cefalorraquídeo artificial (LCFR, 5 μ L), mientras que los grupos Fe (n = 5) y RFe (n = 16) recibieron LCFR conteniendo FeCl_2 (50mM). Se registró la marcha cada 24 h durante 15 días. El contenido de NA se extrajo tanto de los hemisferios cerebelares como de ambos lados del puente y se midió por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las comparaciones conductuales se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney ($p = 0.05$) y las de NA mediante un ANOVA simple ($p = 0.05$).

Los resultados mostraron que la recuperación fue más rápida en los animales con lesión aguda que en las ratas con lesión crónica. También se observó incremento de NA pontina en los animales del grupo AC y un decremento de este neurotransmisor en el grupo Fe encontrándose niveles normales de NA en las ratas recuperadas del daño. La NA cerebelar no se alteró en el grupo AC mientras que en los animales Fe disminuyó. El grupo de animales RFe mostró niveles de NA similares al los del SB. Estos resultados demuestran que los mecanismos noradrenérgicos involucrados en la recuperación después del daño cerebral dependen del tipo de lesión, sugiriendo la necesidad de considerar la naturaleza del daño cuando se implementa el tratamiento de las secuelas en seres humanos.

Palabras clave: Noradrenalina, daño cerebral, cromatografía, puente, cerebelo.

Artículo recibido el 11 de mayo de 2011.

Aceptado el 25 de mayo de 2011.

* Laboratorio de Neuroplasticidad, Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA.

† Laboratorio de Cromatografía y Microdiálisis, INR, SSA,

‡ Laboratorio de Neuroprotección, INR, SSA,

§ Laboratorio de Neuroquímica, INR, SSA,

|| Escuela Superior de Rehabilitación, INR, SSA.

¹ Autor para correspondencia:

Dr. Rigoberto González-Piña
Calz. México-Xochimilco 289
Col. Arenal de Guadalupe
Deleg. Tlalpan. C.P. 14389
México, D.F.

Tels. Ext. (52 55) 5999-1000,
19201 y 19214.

Correo electrónico:

higgo@prodigy.net.mx

Este artículo puede ser consultado

en la dirección electrónica:

www.imbiomed.com.mx

Abstract

It has been discussed that acute and chronic brain injuries involve different patterns of reorganization. In this work we assessed the effects of an acute injury (cortical ablation) and a chronic injury induced with ferrous chloride (FeCl_2) through the measurement of the total content of noradrenalin (NA) on medulla oblongata and cerebellum, since this neurotransmitter has been involved in the functional recovery.

We used 66 male Wistar rats (280-320 g) distributed into six groups: Sham (SA), Sham B (SB) injured by cortical ablation (AC), recovered after ablation cortical RAC), injured by injection - intraparenchymal FeCl_2 within the motor cortex (Fe) and recovered after the injury by Fe (RFe). After a baseline recording of locomotion, the AC rats ($N = 6$) and RAC ($n = 12$) were injured by ablation of the motor cortex (MCx), while the group SA ($n = 11$) was left intact. Subsequently, the progress was recorded every 6 h during 48 h. The remaining animals had fixed a cannula directed to the MCx and the group SB ($n = 16$) was injected with artificial cerebrospinal fluid (LCFR, 5 μL), while the Fe groups ($n = 5$) and RFe ($n = 16$) received LCFR containing FeCl_2 (50mm). We registered locomotion every 24 h during 15 days. The content of NA was extracted from both the cerebellar hemispheres of both sides of the pontine and was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The behavioral comparisons were analyzed by means of the test or Mann-Whitney ($p = 0.05$) and NA through a simple ANOVA test ($p = 0.05$).

The results showed that the recovery was faster in animals with acute injury than in rats with chronic injury. It was also noticed an increased pontine NA in the animals of the AC group and a decrease of this neurotransmitter in the Fe group, while levels of NA in the rats recovered from damage were normal. The cerebellar NA was not changed by the AC group while in Fe animals decreased. The group of animals RFe showed levels of NA similar to those of the SB.

These results show that the noradrenergic mechanisms involved in recovery after brain damage depend on the type of lesion, suggesting the need to consider the nature of the damage when it implements the treatment of the sequel in human beings.

Key words: Brain injury, noradrenalin, chromatography, medulla oblongata, cerebellum.

INTRODUCCIÓN

Los estudios enfocados a evaluar los efectos tanto de lesiones agudas como crónicas son relativamente escasos en animales experimentales. En este contexto, estos estudios han sido realizados utilizando extirpaciones agudas o bien ablaciones quirúrgicas parciales sucesivas de una estructura cerebral. Se ha demostrado en ratas que los déficits más graves se presentan 36 días después de una ablación aguda de la corteza somatosensorial. Esos déficits están ausentes cuando la misma área se remueve en dos etapas.¹ Otro estudio realizado en gatos mostró que los animales caían en un coma profundo y morían después de unos pocos días después de la resección aguda de la formación reticular mesencefálica, en contraste con

los animales lesionados gradualmente (pasando hasta por ocho cirugías) que mostraron una recuperación total.² El mismo patrón ha se ha observado en monos, ya que las ablaciones agudas de la corteza prefrontal producen déficits funcionales que son más severos que los observados después de lesiones seriales.³ Además, los datos obtenidos de pacientes con daño cerebral agudo e invasiones tumorales lentas han permitido discutir que el mismo tipo de disociación se observa en humanos.⁴

De esta manera parecería que las secuelas del daño cerebral son menores en las lesiones crónicas que en las lesiones agudas. En este contexto, el mecanismo de recuperación podría diferir entre lesiones producidas por trauma, apoplejía o inducidas por hipoxia. Considerando estos hechos, es importante tomar en cuenta la

etiología de la lesión que el paciente sufre con el fin de prescribir el tratamiento adecuado.

Se ha sugerido que el daño cortical induce déficit motores mediados por la inhibición de sitios remotos relacionados con la región dañada.⁵ Esta inhibición podría estar mantenida por la severidad del daño, sugiriendo entonces que ciertas lesiones crónicas mantendrían esa inhibición por un periodo mayor que cuando se produce una lesión aguda, en contraste con los datos descritos en párrafos anteriores.

El papel de la noradrenalina (NA) en la recuperación después del daño cerebral se ha documentado ampliamente.^{6,7} Se ha reportado que las infusiones de NA dentro del cerebelo⁸ y la administración de amfetamina, un agonista noradrenérgico,⁹ previene del déficit motor asociado con el daño. Este hecho también se ha observado después de la administración sistémica de L-threo-3, 4-dihydroxyphenylserina (L-DOPS), un precursor de NA.¹⁰ Algunos estudios realizados mediante microdiálisis han mostrado que la NA extracelular en el cerebelo disminuye después del daño cerebral.¹¹ Son muy pocos los datos disponibles acerca del papel del puente en los cambios noradrenérgicos observados en el cerebelo después del daño. Se sabe que el puente contiene al locus coeruleus (LC), el principal reservorio noradrenérgico del sistema nervioso central¹² y se han descrito las relaciones anatómicas entre el LC, la corteza motora y el cerebelo.^{13,14} Ante esto, se ha descrito un incremento de NA en el puente 6 horas después de la ablación cortical¹⁵ que podría estar relacionado con las secuelas motoras medidas por el análisis de la huella, lo que podría ser un ejemplo de un daño agudo en animales experimentales. En este trabajo se reportan los efectos sobre el contenido de NA pontina y cerebelar de una lesión inducida por administración de FeCl₂ en la corteza motora, como un ejemplo de lesión crónica y se comparan con los resultados obtenidos de grupos de animales con lesión por ablación (lesión aguda), con el objetivo de discutir sobre los posibles mecanismos involucrados en la expresión de las secuelas del daño.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 66 ratas macho Wistar (280-320 g) proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación. Los animales se mantuvieron alimentados con alimento para roedores de laboratorio (Purina) y con un ciclo de luz-oscuridad 12-12 (luz a las 7:00 a.m.). Las ratas fueron adaptadas a las condiciones del laboratorio al menos una semana previa a las cirugías. Durante este tiempo, las ratas se manipularon diariamente con el objeto de habituarlas al ma-

nejo experimental y posteriormente se les entrenó para caminar dentro de un corredor de madera en cuyo piso se colocó una tira de papel (6.8 x 100 cm) con el objeto de obtener la impresión de sus huellas, como se describe en González-Piña, et al.^{15,16} Las ratas fueron tratadas de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales experimentales¹⁷ y a los criterios de Festing.¹⁸

Los animales fueron asignados azarosamente a seis grupos: Sham A (SA; n = 11), Sham B (SB; n=16), lesionadas por ablación cortical (AC; n = 6), recuperadas después de la ablación cortical (RAC; n = 12), lesionadas por inyección intraparenquimal de FeCl₂ dentro de la corteza motora (Fe; n = 5), y recuperadas después de la lesión por Fe (RFe; n = 16).

Veinticuatro horas antes de las cirugías, un pre-registro basal de la huella fue tomado en todas las ratas. Luego los animales se anestesiaron con ketamina-xilacina (100 mg/kg-5 mg/kg) y fueron montados en un aparato estereotáxico (David Kopf). El cráneo se expuso mediante una incisión del cuero cabelludo y se realizó un trépano de 1 mm de diámetro aproximadamente, sobre el sitio cortical representativo del miembro posterior izquierdo¹⁹ situado en las siguientes coordenadas: Posterior 2 mm y lateral 2 mm con respecto a bregma. Las ratas de los grupos AC y RAC fueron dañadas en esta área cortical motora (MCx) mediante la aspiración del tejido usando una bomba de vacío (Stoelting, mod. 6C) acoplada a una pipeta de vidrio (1 mm de diámetro). Por otro lado, todos los procedimientos quirúrgicos con excepción de la aspiración fueron realizados al grupo SA. Una vez que los animales se recuperaron de los efectos de la anestesia, la huella fue registrada cada 6 h durante 48 h. En los sujetos restantes, se colocó quirúrgicamente una cánula dirigida a la MCx, que fue fijada sobre el cráneo con acrílico dental. Una vez que esos animales se recuperaron de la cirugía, se inyectó líquido cefalorraquídeo artificial (LCFR, 5 µL) a los animales del grupo SB, mientras que a los grupos Fe y RFe se les inyectó LCFR conteniendo FeCl₂ (50 mM) en condiciones de libertad de movimientos. Posteriormente el registro de la huella fue realizado cada 24 horas durante 20 días. Las ratas del grupo Fe fueron sacrificadas por decapitación dos días después de que se administró la inyección intraparenquimal de FeCl₂.

Al final de los periodos de registro, los grupos restantes de ratas se sacrificaron por decapitación y tanto los lados derecho e izquierdo del puente como los hemisferios cerebelares fueron extraídos. El cerebro completo fue colocado en una plancha fría para extraer el puente y el cerebelo, que fueron divididos en sus lados derecho e izquierdo. Los tejidos se colectaron en tubos de teflón conteniendo una solución de 0.5 mL de ácido

perclórico 0.4 N conteniendo 0.1% p/v de metabisulfito de sodio. Después los tejidos fueron homogeneizados y centrifugados a 15,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado y almacenado a -70 °C hasta su análisis cromatográfico. El contenido de NA fue analizado por cromatografía de líquidos alta resolución (HPLC, ALLTECH 626) acoplado a un detector electroquímico coulombiométrico (Coulochem III, ESA, Inc.). Los picos se integraron en una computadora con un programa Agilent EZ Chrom SI. Para determinar las concentraciones de NA, los cromatogramas de las muestras fueron interpolados con los cromatogramas obtenidos de cuatro muestras estándar, cuyas concentraciones de NA eran conocidas. Se utilizó una columna analítica específica para catecolaminas (ALLTECH, adsorbosphere C18 100 X 4.8 mm, 3 µm de tamaño de partícula). La fase móvil utilizada consistió de una solución de buffer de fosfatos (0.1 mM, pH 3.2) cuya composición fue (en mM): octil sulfato de sodio (0.2), EDTA (0.1) y metanol (15% v/v). El flujo empleado fue de 1.2 mL/min mientras que el potencial fue ajustado a 0.65 V contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

El encéfalo restante fue puesto en una solución de formol amortiguado al 10% para delinear la lesión por medio de la tinción de Kluver-Barrera. Después de la observación por microscopia de luz, la cavidad fue dibujada sobre los esquemas equivalentes tomados del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson.²⁰

Las comparaciones estadísticas entre los valores obtenidos del análisis de la huella (largo, ancho y ángulo de la zancada, *Figura 1*) se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney ($p = 0.05$), mientras que las comparaciones obtenidas del contenido total de NA se realizaron mediante un ANOVA de una sola vía ($p = 0.05$).

RESULTADOS

Después de que los cortes cerebrales se procesaron, se observó que la cavidad correspondiente a las ratas con ablación comenzó a los -1.6 mm desde bregma, alcanzó un máximo entre -2.56 mm y -2.80 mm y disminuyó a un tamaño final entre -3.14 mm y -3.60 mm (*Figura 2*), área que cubre la representación cortical motora representativa del miembro posterior, según Hall y Lindholm.¹⁹ En el caso de la ablación cortical, fue frecuente observar zonas de gliosis (*Figura 2A*). Por otro lado, las ratas lesionadas con FeCl₂ mostraron una cicatriz localizada dentro de la MCx aproximadamente a 1.5 mm de profundidad y a -2 mm de bregma (*Figura 2B*).

El análisis de la huella mostró que todos los animales dañados por ablación tuvieron una disminución

Figura 1
Parámetros de la zancada medidos en una huella típica. L Longitud de la zancada (en cm), W ancho de la zancada (en cm) y An ángulo de la zancada (medido en grados).

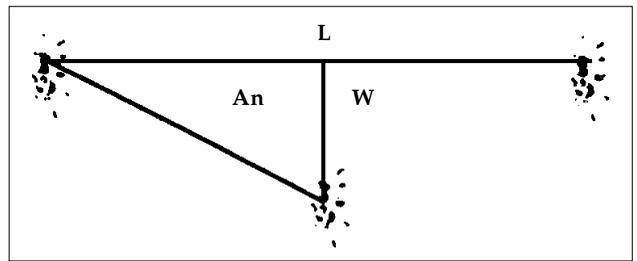
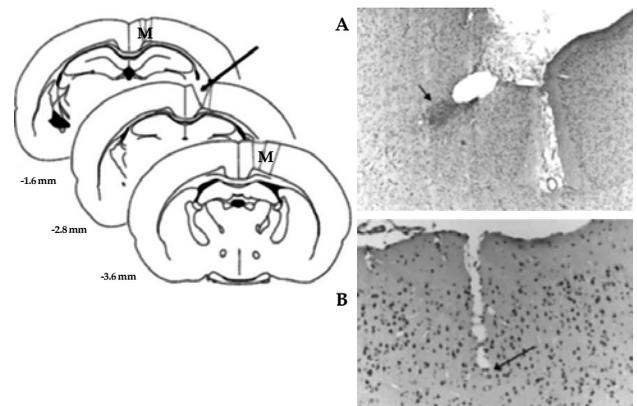


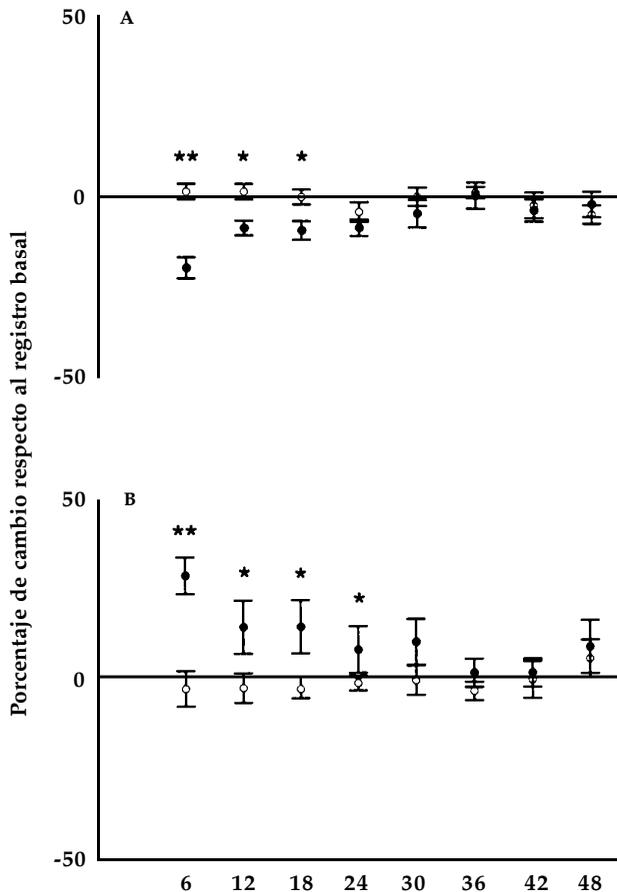
Figura 2
Representación esquemática que muestra la extensión de la lesión (izquierda) y fotomicrografías tomadas en las zonas corticales equivalentes (derecha). El área más pronunciada de la lesión se dibujó en forma de cavidad (flecha) sobre los esquemas equivalentes del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson 20, donde los números que aparecen debajo de cada esquema indican los milímetros de distancia a partir de bregma. Se observa que la lesión se circunscribe a la corteza motora, particularmente en el área representativa del miembro posterior (M) corteza motora primaria. En las microfotografías de la izquierda se muestra la morfología de ambas lesiones. A. Lesión cortical realizada por ablación del tejido, en la que la flecha muestra una zona de gliosis (10X). B. Corte que muestra el tracto de la aguja utilizada para inyectar la solución de FeCl₂ dentro del parénquima cortical. La flecha muestra la punta de la aguja, que es el sitio exacto en el que se liberó la solución (40X).



significativa en el largo de la zancada después de 6 h ($-8.00\% \pm 2.4$; $p \leq 0.001$; *Figura 3A*), con un incremento en el ángulo ($22.11\% \pm 4.65$; $p \leq 0, 003$; *Figura 3B*), mientras que el ancho de la zancada no mostró cambios significativos. Como se muestra en estas figuras, la recuperación se observó 24 horas después del daño, donde el promedio del porcentaje de cambio

Figura 3

Parámetros de la zancada medidos en la impresión de la huella. Los datos referentes al ancho de la zancada no se presentan debido a que no mostraron diferencias significativas. (A) Por ciento de cambio con respecto a la línea base en la longitud de la zancada, medida cada 6 h durante 48 horas después de la cirugía. Se observa un acortamiento importante después de 6 h en los animales dañados y una recuperación 24h después de la lesión. Los datos están expresados como media \pm e.s.m. U Mann-Withney (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). ° grupo Sham; • grupo AC. (B) Por ciento de cambio con respecto a la línea base en el ángulo de la zancada, donde se observa un incremento significativo después de 6 h post-lesión. La recuperación se observó 30 h después de la lesión, aunque se observa una diferencia marginalmente significativa en el punto inmediato a las 24 h. Después, la magnitud del ángulo se mantuvo estadísticamente igual por al menos 48 h en ambos grupos. Los datos están expresados como media \pm e.s.m. U Mann-Withney. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). ° grupo Sham A; • grupo AC.



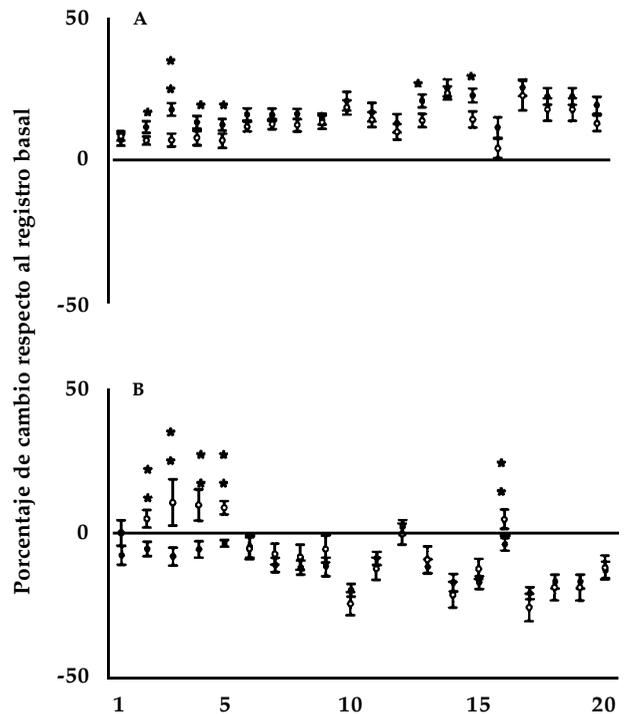
con respecto al basal no es significativo. Esta recuperación se sostuvo durante 48 h post-lesión. En contraste, los animales dañados mediante administración intraparenquimal de $FeCl_2$ (Figura 4) mostraron un aumento significativo en el largo de la zancada duran-

te los días 2-3 después de la inyección (12-18%; $p \leq 0.0086$) y un decremento en el ángulo de la zancada en los días 2 (-5.24 ± 3.08 ; $p \leq 0.013$), 3 ($-8 \% \pm 3.13$; $p \leq 0.021$), 4 ($-5.5 \% \pm 2.87$; $p \leq 0.014$) y 5 ($-3.3\% \pm 1.19$; $p \leq 0.007$).

Cuando el promedio del contenido total de NA se analizó tanto en el lado derecho como en el izquierdo del puente (Cuadro 1), se encontró que las ratas AC (6 horas después del daño inducido por ablación) mostraron un incremento significativo de NA medida en el lado derecho, comparados con los grupos SA y RAC.

Figura 4

Parámetros medidos en la huella. Los datos referentes al ancho de la zancada no se presentan debido a que no mostraron diferencias significativas. En términos generales, se observa una variabilidad muy amplia en los valores del largo y el ángulo en ambos grupos (A) Por ciento de cambio con respecto a la línea base en la longitud de la zancada, medida cada 24 horas durante 20 días post-lesión. Se observa un incremento importante después de dos días y la recuperación sobrevino 15 días después de la lesión, aunque se observaron algunas secuelas tardías en los días 13 y 15. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. U Mann-Withney (* $p \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$). ° grupo Sham; • grupo AC. (B) Por ciento de cambio con respecto a la línea base en el ángulo de la zancada, donde se observó un decremento significativo dos días después de la lesión. La recuperación se observó seis días post-lesión, aunque también se observó una secuela tardía en el día 16. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. U Mann-Withney (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). ° grupo Sham; • grupo AC.



Cuadro 1

Contenido de noradrenalina (en ng/g de tejido fresco) medido en el puente y cerebelo, en ratas del grupo Sham, dañadas por ablación cortical (6h) y en ratas recuperadas (48h)

	Sham	6 h post-lesión	48 h post-lesión
		Puente	
Derecha	7.17 ± 1.08	9.76 ± 0.72 ^{a,b}	6.76 ± 0,87
Lado izquierdo	7.30 ± 0.79	10.16 ± 0.78 ^{a,b}	7.11 ± 0.99
		Cerebelo	
Hemisferio derecho	7.26 ± 0.89	7.47 ± 0.77	7.40 ± 0.93
Hemisferio izquierdo	6.95 ± 1.03	8.46 ± 0.66	8.72 ± 1.25

^a: significativo con respecto al grupo Sham. ^b: significativo con respecto al grupo 48 h post-lesión.

Cuadro 2

Contenido de noradrenalina medido (en ng/g de tejido fresco) en el puente y cerebelo, en ratas del grupo Sham, dañadas por Inyección de FeCl₂ (2 días post-lesión) y en ratas recuperadas (20 días post-lesión)

	Sham	2 días post- lesión	20 días post-lesión
		Puente	
Derecha	3.12 ± 0.54	ND	2.75 ± 0.44
Lado izquierdo	3.35 ± 0.97	ND	3.23 ± 0.58
		Cerebelo	
Hemisferio derecho	7.11 ± 0.90	0.29 ± 0.18 ^{a,b}	3.78 ± 1.88
Hemisferio izquierdo	7.10 ± 0.81	0.31 ± 0.19 ^{a,b}	11.06 ± 4.87

ND: Cantidades no detectables. ^a: significativo con respecto al grupo Sham. ^b: significativo con respecto a 20 días post-lesión.

El mismo patrón de cambio se encontró en el lado izquierdo ($p \leq 0.017$), mientras que no hubo diferencias significativas entre los niveles de NA encontrados en los dos lados del puente de cada rata. Asimismo, el contenido de NA cerebelar no mostró diferencias significativas entre los hemisferios derecho ($p \leq 0.723$) e izquierdo ($p \leq 0.565$).

En el caso del daño inducido por FeCl₂ (Cuadro 2) se encontró que los niveles de NA después de dos días post- lesión estuvieron completamente agotados en ambos lados del puente de las ratas pertenecientes al grupo Fe. Sin embargo, los niveles de NA encontrados en ambos lados del puente de las ratas del grupo RFe fueron muy similares a los observados en las ratas del grupo SB. Por otro lado, el contenido de NA cerebelar se encontró significativamente disminuido tanto en el hemisferio derecho ($p \leq 0.001$) como en el izquierdo ($p \leq 0.003$) de las ratas del grupo Fe, dos días después de que la lesión se realizó.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que las variaciones en las lesiones cerebrales inducen efectos diferenciales sobre la NA pontina y cerebelar, además de los parámetros de la huella. En el caso de la ablación cortical, el contenido de NA se elevó 6 h

después de la cirugía y cuando los animales se recuperaron, la NA pontina se encontró en niveles similares a los hallados en las ratas Sham después de 48 h de la cirugía. Por otro lado, la NA se halló completamente agotada en el puente dos días después de que los animales fueron dañados con FeCl₂, mientras que después de 20 días de realizado el daño los niveles de NA se encontraron normales. Esto se observó en ambos lados del puente. Se sabe que la inervación del LC a la MCx es ipsilateral 14, por lo que se esperaría que un daño en la MCx produzca un efecto ipsilateral sobre el LC. Sin embargo, los cambios de NA se observaron en los dos lados de puente, lo que sugiere la existencia de una retroalimentación entre ambos lados pontinos. Hay fuerte evidencia de que los efectos conductuales del daño cortical motor resultan de una depresión funcional en áreas cerebrales remotas e intactas, pero relacionadas con el sitio dañado, concepto conocido como diasquisis.²¹ Esto parece ser aplicable en el caso de una lesión crónica donde la NA disminuye cuando la secuela motora es más alta. En el caso de la lesión aguda (ablación cortical), el incremento de NA en el puente pudiera también ser parte de esa depresión funcional, ya que la NA podría poseer un mecanismo autoinhibitorio dentro del puente como ha sido propuesto previamente.²²

Nuestros resultados sugieren que la diasquisis está involucrada, sin importar los mecanismos implicados, debido a que ambos modelos de lesión representan un daño cerebral circunscrito, característica añadida a la existencia de una base neuronal para explicar esta depresión funcional, la participación de una estructura remota relacionada con el sitio de la lesión (el puente), relaciones anatómicas entre el puente y la corteza, y además el proceso es reversible.³²

En este contexto, los estudios farmacológicos sugieren que la inhibición de la liberación de NA en las células post-sinápticas podría estar mediada por los adrenoceptores α_2 ,^{23,24} ampliamente distribuidos en las neuronas del LC. De esta manera, el enlace de la NA pontina a estos receptores podría producir la disminución en la liberación cerebelar de NA reportada después del daño en la MCx.¹¹ Específicamente, el receptor involucrado podría ser el α_2A , que se encuentra en 100% de las neuronas de LC de la rata²⁵ y se ha reportado que un agonista α_2 inhibe la liberación de NA en 96%.²⁶ La acción inhibitoria de NA también ha sido observada en otras áreas cerebrales, tal como la inhibición colinérgica mediada por NA en los núcleos tegmentales.²⁷

Entonces, nuestros resultados muestran que se está frente a dos mecanismos de diasquisis: Uno podría estar mediado por la depleción de la NA pontina, quizá como consecuencia de la reconstrucción de los circuitos dañados por el estrés oxidativo derivado de la administración de $FeCl_2$. Es posible que en este caso las neuronas noradrenérgicas sinteticen proteínas estructurales en lugar de NA, para reconstruir los axones dañados. Por otro lado, el daño agudo produce un incremento de NA que también podría dirigir a la inhibición, esta vez mediado por los receptores alfa. Ambos mecanismos producen alteraciones motoras que son consistentes con la evaluación motora. El análisis de la huella mostró que el largo de la zancada disminuyó en los animales del grupo AC, pero se incrementó en los animales Fe, cuando los niveles de NA se incrementaron y disminuyeron, respectivamente. También se observó que el ángulo de la zancada se incrementó en los animales CA mientras que disminuyó en las ratas Fe. Entonces es aparente una relación negativa entre el contenido de NA pontina y el largo de la zancada, mientras que una relación positiva entre el contenido de NA y al ángulo de la zancada parece estar presente.²⁸

No está claro cómo el daño cortical unilateral resulta en un incremento bilateral de NA pontino, ya que la inervación entre el LC y la corteza es predominantemente ipsilateral.¹⁴ Es posible que los efectos del daño unilateral en la MCx tengan una influencia en ambos

lados del puente.¹¹ En cambio, la inervación del LC al cerebelo es bilateral²⁹ y los efectos de la lesión de MCx sobre el cerebelo pueden llevar a efectos retrógrados bilaterales dentro de las neuronas del LC. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles cerebelares de NA. La mayoría de la literatura ha mostrado que NA cerebelar está involucrada en los mecanismos que participan en la recuperación, por ejemplo, una disminución NA cerebelar se ha reportado después de la lesión cortical^{18,11} y esos niveles retornan a los valores normales cuando se administra anfetamina.^{6,8} También se ha reportado que las infusiones de NA en el cerebelo facilitan la recuperación después del daño cortical sensoriomotor.⁸ Estas observaciones apoyan la existencia de un mecanismo cerebelar mediado por NA, mecanismo que lleva a la recuperación después del daño cerebral.³³ La ausencia de cambios en el contenido de NA cerebelar encontrada en ratas con ablación sugiere que la actividad noradrenérgica en el cerebelo relacionada con la recuperación está delimitada en regiones discretas como podría ser la corteza cerebelar. Se sabe que las porciones dorsal y ventral del LC inervan a las neuronas de la corteza cerebelar y, en menor extensión, a los núcleos cerebelares.^{30,31} Sin embargo, la extensión del daño podría amplificarse en el caso de una lesión crónica, debido a que las ratas dañadas con hierro mostraron una importante disminución de NA después de dos días post-lesión.

De esta forma, en este trabajo se demuestra que las alteraciones motoras dependen del tipo de daño y que la inhibición funcional remota podría estar mediada por efectos diferenciales sobre la NA pontina. Por otro lado, se encontró que cuando los animales se recuperan del daño motor, muestran niveles de NA pontina muy similares a los encontrados en ratas Sham 48 h después de la cirugía, sugiriendo un papel importante del puente en la inhibición cerebelar después del daño cortical. Asimismo, la carencia de efectos sobre el contenido cerebelar de NA después de la ablación abre la necesidad de investigar áreas cerebelares específicas relacionadas con la recuperación después del daño cortical. Esto también aplica a la dimensión cerebelar global observada después del daño inducido por $FeCl_2$, ya que una depleción generalizada de NA podría dirigir a una disfunción conductual mayor, tales como síntomas atáxicos y alteraciones en el balance.

La relevancia de este estudio acerca de los mecanismos bioquímicos que conducen a la recuperación después del daño cerebral es pertinente para el desarrollo de estrategias farmacológicas que mejoren la recuperación en humanos. Debe notarse que los resultados obtenidos en experiencias clínicas son muy similares a los observados en los animales experimentales,³⁴ su-

giriendo que los mecanismos básicos de recuperación también son parecidos entre la rata y el humano.

Finalmente debe considerarse que el uso clínico de agonistas y antagonistas noradrenergicos en humanos con secuelas de daño cerebral, tales como antidepresivos y ansiolíticos, podrían acortar o alargar el tiempo en el que la depresión neuronal remota ocurre, facilitando o dificultando a la recuperación funcional. Más estudios son necesarios a fin de esclarecer los mecanismos detallados subyacentes a la recuperación cerebral después del daño. En particular el papel específico del LC en la depresión funcional noradrenérgica debe de ser estudiado.

REFERENCIAS

1. Finger S, Marshak RA, Cohen M, Scheff S, Trace R, Niemand D. Effects of successive and simultaneous lesions of somatosensory cortex on tactile discrimination in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1971; 77: 221-7.
2. Adametz J. Rate of recovery of functioning in cats with rostral reticular lesions; an experimental study. *J Neurosurg* 1959; 16: 85-97.
3. Rosen J, Stein D, Butters N. Recovery of function after serial ablation of prefrontal cortex in the rhesus monkey. *Science* 1971; 994(173): 353-6.
4. Desmurget M, Bonnetblanc FC, Duffau H. Contrasting acute and slow-growing lesions: a new door to brain plasticity. *Brain* 2007; 130: 898-914.
5. Nudo RJ, Plautz EJ, Frost SB. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle & Nerve* 2001; 24, 8: 1000-19.
6. Goldstein LB. Amphetamine-facilitated functional recovery after stroke. In: Ginsberg MD, Dietrich WD (eds.). *Cerebrovascular Diseases: Sixteenth Research (Princeton) Conference*. New York, NY: Raven Press; 1999, p. 303-8.
7. Godstein LB. Neuropharmacology of TBI-induced plasticity. *Brain Injury* 2003; 17: 685-94.
8. Boyeson MG, Krobert KA. Cerebellar norepinephrine infusions facilitate recovery after sensorimotor cortex injury. *Brain Res Bull* 1992; 29: 435-9.
9. Sutton RL, Hovda DA, Chen MJ, Feeney DM. Alleviation of brain injury-induced cerebral metabolic depression by amphetamine: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neural Plast* 2000; 7: 109-25.
10. Kikuchi K, Nishino K, Ohya H. Increasing CNS norepinephrine levels by the precursor L-DOPS facilitates beam-walking recovery after sensorimotor cortex ablation in rats. *Brain Res* 2000; 860: 130-5.
11. Krobert KA, Sutton RL, Feeney DM. Spontaneous and amphetamine-evoked release of cerebellar noradrenaline after sensorimotor cortex contusion: an in vivo microdialysis study in the awake rat. *J Neurochem* 1994; 62: 2233-40.
12. Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. Review. *Brain Res* 2003; 42: 33-84.
13. Cicirata F, Zappalà A, Serapide MF, Parenti R, Pantò MR, Paz C. Different pontine projections to the two sides of the cerebellum. Review. *Brain Res* 2005; 49: 280-94.
14. Steindler DA. Locus coeruleus neurons have axons that branch to the forebrain and cerebellum. *Brain Res* 1981; 223: 367-73.
15. Gonzalez-Pina R, Bueno-Nava A, Montes S, Alfaro-Rodriguez A, Gonzalez-Maciél A, Reynoso-Robles, et al. Pontine norepinephrine content alter motor cortical ablation in rats. *Proc West Pharmacol Soc* 2005; 48: 73-6.
16. Gonzalez-Pina R, Bueno-Nava A, Alfaro-Rodriguez A, Durand-Rivera JA. Caracterización de la conducta motora en ratas con ablación cortical *Rev Neurol* 2008; 47: 304-9.
17. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide for the care and use of experimental animals. *Can Council Animal Care* 1993; 1: 211.
18. Festing MFW. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab Anim Sci* 1994; 28: 212-21.
19. Hall RD, Lindholm EP. Organization of motor and somatosensory neocortex in albino-rat. *Brain Research* 1974; 66: 23.
20. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Australia: Academic Press 1982.
21. Serteser M, Ösben T, Gümüslü S, Balkan S, Balkan E. Biochemical evidence of crossed cerebellar diaschisis in terms of nitric oxide indicators and lipid peroxidation products in rats during focal cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand* 2001; 103: 43-8.
22. Gonzalez-Pina R, Bueno-Nava A, Montes S, Alfaro-Rodriguez A, Gonzalez-Maciél A, Reynoso-Robles R, Ayala-Guerrero F. Pontine and Cerebellar Norepinephrine Content in Adult Rats Recovering from Focal Cortical Injury. *Neurochem Res* 2006; 31: 1443-9.
23. Washburn M, Moises HC. Electrophysiological correlates of presynaptic alpha 2-receptor mediated inhibition of norepinephrine release at locus coeruleus synapses in dentate gyrus. *J Neurosci* 1989; 9: 2131-40.
24. Nasseri A, Minneman KP. Relationship between alpha 2-adrenergic receptor binding sites and the

- functional receptors inhibiting norepinephrine release in rat cerebral cortex. *Mol Pharmacol* 1987; 32: 655-62.
25. Smeets WJ, Gonzalez A. Catecholamine system in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Rev* 2000; 33: 308-79.
 26. Bucheller MM, Hadamek KK, Hein L. Two alpha (2)-adrenergic receptor subtypes, alpha (2A and alpha (2C), inhibit transmitter release in the brain of gene targeted mice. *Neuroscience* 2002; 109: 819-26.
 27. Hobson JA, McCarley RW The brain as a dream state generator: an activation synthesis hypothesis of the dream process. *Am J Psychiatry* 1977; 134: 1335-48.
 28. Bueno-Nava A, Montes S, DelaGarza-Montano P, Alfaro-Rodriguez A, Ortíz A, González-Piña R. Reversal of noradrenergic depletion and lipid peroxidation in the pons after brain injury correlates with motor function recovery in rats. *Neuroscience Letters* 2008; 443: 32-6.
 29. Room P, Postema F, Korf J. Divergent axon collaterals of rat locus coeruleus neurons: demonstration by a fluorescent double labeling technique. *Brain Res* 1981; 221: 219-30.
 30. Schambra UB, Mackensen GB, Stafford-Smith M, Haines DE, Schwinn DA. Neuron specific alpha-adrenergic receptor expression in human cerebellum: implication for emerging cerebellar roles in neurologic disease. *Neuroscience* 2005; 135: 507-23.
 31. Schweighofer N, Doya K, Kuroda S. Cerebellar aminergic neuromodulation: towards a functional understanding. *Brain Res Rev* 2004; 44: 103-16.
 32. Feeney DM, Baron JC. Diaschisis. *Stroke* 1986; 17: 817-30.
 33. Ríos-Romenets S, Castaño-Monsalve B, Bernabeu-Guitart M. Farmacoterapia de las secuelas cognitivas secundarias a traumatismo craneoencefálico. *Rev Neurol* 2007; 45: 563-70.
 34. Goldstein LB. Effects of amphetamines and small related molecules on recovery after stroke in animals and man. *Neuropharmacology* 2000; 5(39): 852-9.