



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA L-DOPA Y LA REBOXETINA SOBRE LA RECUPERACIÓN
MOTORA Y LOS NIVELES DE DOPAMINA, NORADRENALINA, DOPAC Y HVA
EN DISTINTAS REGIONES CEREBRALES EN UN MODELO DE LESIÓN
OXIDANTE DE LA CORTEZA MOTORA EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

FUENTES BELLO ALIM CAELLI

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. PAUL CARRILLO MORA

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

COMITÉ TUTOR: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MIGUEL ÁNGEL PÉREZ DE LA MORA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CD. MX., AGOSTO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 08 de mayo de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **FUENTES BELLO ALIM CAELLI** con número de cuenta **303247649**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA L-DOPA Y LA REBOXETINA SOBRE LA RECUPERACIÓN MOTORA Y LOS NIVELES DE DOPAMINA, NORADRENALINA, DOPAC Y HVA EN DISTINTAS REGIONES CEREBRALES EN UN MODELO DE LESIÓN OXIDANTE DE LA CORTEZA MOTORA EN RATAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. PAUL CARRILLO MORA**:

Presidente: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Vocal: DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ
Secretario: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE
Suplente: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
Suplente: DR. MIGUEL ANGEL PÉREZ DE LA MORA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 09 de mayo de 2017

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicial y ampliamente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por haber sido el pilar en mi formación académica, por ofrecer siempre la opción de ampliar mis conocimientos a través de sus materias optativas y enriquecerlas con los profesores dedicados a la investigación científica en campos específicos.

En segundo lugar, sin ser menos importante, agradezco el apoyo recibido a través de la beca que ofrece CONACYT al proyecto con registro 508871/288758, lo cual contribuyó a mi dedicación de tiempo completo a la maestría y la culminación satisfactoria del trabajo.

Así también agradezco con la mano en el pecho a mi tutor principal, el Dr. Paul Carrillo Mora por su apoyo incondicional, los conocimientos aportados día a día, la paciencia, la ética profesional con la que siempre se conduce, el compromiso con cada alumno que recibe en su laboratorio, la pasión que marca cada uno de los trabajos realizados tanto en investigación básica como en la clínica y la humildad que impulsa al crecimiento constante.

De la misma manera, agradezco a la Dra. Laura Colín Barenque y al Dr. Pérez de la Mora por ser guía durante el desarrollo de mi investigación, por contribuir enormemente al mejoramiento de mi proyecto, fomentarme dudas, ampliar mis conocimientos en el campo de la neurociencia y ser fuente de inspiración para llegar a ocupar un lugar privilegiado en el ámbito científico.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi madre, la principal fuente de inspiración, el modelo a seguir, quien ha sabido alentarme en cada momento de adversidad con sus palabras y caricias, la mujer fuerte, perseverante y entregada en cada paso que da, las manos incansables, los pies de plomo, de corazón generoso, noble, perspicaz, activa, ingeniosa e inteligente que siempre ha sabido mantener el temple para conducir a su familia y orientarme por un camino lleno de valores y amor, a quien le debo la vida y los sabios consejos para ser madre. La mujer que merece todo mi respeto y admiración.

Agradezco a mi padre, el hombre que me inspiró hacia las ciencias, a perseguir mis sueños, quién impulsó mi carrera y deseo de aprender; que de manera peculiar siempre me reprendió y corrigió, el temperamento fuerte y a la vez noble, un amigo y maestro de vida.

No puedo dejar de lado a mi cómplice, mi complemento, que de alguna manera siempre ha sabido encaminarme cuando quiero tomar atajos, mi paño de lágrimas, el empujón cuando me estaciono, esa ventisca que te hace recordar de donde vienes y hacia dónde te diriges, la mujer que no tiene matices, mi claro-oscuro, mi hermana.

DEDICATORIA

A medida que crecían mi conocimientos y avanzaba mi proyecto de investigación, también crecía dentro de mí el más grande motivo y fuente de inspiración, el ser que llegaría a cambiar mi vida, quien lograría mi concentración y en muchas ocasiones mi distracción con su encantadora manera de hacerlo, la mujer que estará siempre en mi corazón, Helena.

ÍNDICE

Página

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	II
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. OBJETIVOS.....	5
V. ANTECEDENTES.....	6
VI. METODOLOGÍA.....	10
ANIMALES Y GRUPOS.....	10
EVALUACIÓN CONDUCTUAL.....	11
PRUEBAS NEUROQUÍMICAS.....	16
VII. RESULTADOS.....	17
AJUSTE DE PASOS.....	17
BARRA DE EQUILIBRIO.....	19
CILINDRO.....	21
IMPRESIÓN DE HUELLAS.....	22
CATECOLAMINAS.....	26
VIII. DISCUSIÓN.....	29
IX. CONCLUSIONES.....	36
X. LITERATURA CITADA.....	37

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	PÁGINA
FIGURA 1. PRUEBA DE LA BARRA DE EQUILIBRIO.....	12
CUADRO 1. EVALUACIÓN DE BARRA DE EQUILIBRIO.....	13
FIGURA 2. PRUEBA DE AJUSTE DE PASOS	14
FIGURA 3. PRUEBA DE CILINDRO.....	14
FIGURA 4. PRUEBA DE IMPRESIÓN DE HUELLAS.....	15

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	PÁGINA
GRÁFICA 1. PRUEBA DE AJUSTE DE PASOS.....	18
GRÁFICA 2. BARRA DE EQUILIBRIO	20
GRÁFICA 3. CILINDRO.....	21
GRÁFICA 4. IMPRESIÓN DE HUELLAS (LARGO DE ZANCADA).....	23
GRÁFICA 5. IMPRESIÓN DE HUELLAS (ANCHO DE ZANCADA).....	24
GRÁFICA 6. IMPRESIÓN DE HUELLAS (ÁNGULO DE ZANCADA).....	25
GRÁFICA 7. CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS EN ESTRIADO (NIVELES DE DA).....	27
GRÁFICA 8. CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS EN ESTRIADO (NIVELES DE DOPAC).....	27
GRÁFICA 9. CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS EN ESTRIADO (NIVELES DE NA).....	28
GRÁFICA 10. CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS EN ESTRIADO (NIVELES DE HVA).....	28

I. RESUMEN

Introducción: Las lesiones cerebrales agudas más frecuentes en el paciente adulto son la enfermedad vascular cerebral (EVC) y el traumatismo craneoencefálico (TCE). Se estima que más del 30% de estos pacientes desarrollan secuelas severas y hasta un 50% de ellos persistirán con discapacidad severa y permanente a pesar de haber recibido una adecuada terapia de rehabilitación. Por lo tanto, resulta muy importante el desarrollo e implementación de nuevas estrategias que mejoren los resultados de la rehabilitación convencional. Los esquemas de tratamiento actual solo consideran el uso sintomático de algunos fármacos para el manejo de las secuelas de estas lesiones (espasticidad, epilepsia, depresión, insomnio, etc.). Existe evidencia previa tanto experimental como clínica acerca de los efectos positivos que ejerce la modulación noradrenérgica y dopaminérgica sobre la recuperación motora. Sin embargo, aún no hay evidencia suficiente que apoye el uso sistemático de fármacos dopaminérgicos y noradrenérgicos como tratamiento adyuvante a la neurorehabilitación, ni se ha establecido de forma clara cuál de estos dos sistemas de neurotransmisión participa de forma más significativa en la recuperación motora. **Objetivo:** Demostrar que la modulación de la plasticidad sináptica a través de la administración de levodopa y reboxetina mejora significativamente la recuperación motora en ratas con una lesión de la corteza cerebral y correlacionar dichos efectos con los niveles de dopamina, noradrenalina y sus metabolitos. **Método:** se utilizaron ratas Wistar macho (280-300g), las cuales fueron distribuidas en cuatro grupos, el grupo control (6 ratas), y los grupos experimentales lesionados con cloruro ferroso: FeCl₂ (6 ratas), FeCl₂+L-DOPA 50mg/kg/día/10 días (6 ratas) y FeCl₂+Reboxetina 10mg/kg/día/10 días (6 ratas), se realizó cirugía estereotáxica para lesionar la corteza motora primaria mediante la difusión de cloruro ferroso y posteriormente se evaluó el desempeño conductual mediante 4 pruebas conductuales: cilindro, ajuste de pasos, impresión de huellas y barra de equilibrio en tres ocasiones, día 1, 5 y 10 post-lesión, finalmente se midieron los niveles de catecolaminas por HPLC al finalizar el tratamiento. **Resultados:** se logró mejorar el desempeño de las ratas en las pruebas de ajuste pasos, barra de equilibrio e impresión de huellas con los levodopa y reboxetina, a partir del día 5 de evaluación, también se observa una diferencia entre la utilización del miembro anterior izquierdo respecto al derecho en la prueba de cilindro, lo cual apoya la hipótesis planteada; respecto a los datos de cuantificación de catecolaminas, se observan diferencias entre el estriado del lado ipsilesionado y el lado contralateral en los niveles de dopamina, DOPAC, HVA y noradrenalina, sin embargo no se logra correlacionar los datos conductuales con los niveles de catecolaminas. **Conclusiones:** Se logró modular la plasticidad sináptica mediante la administración de levodopa y reboxetina de manera independiente, logrando la recuperación motora en ratas con una lesión de la corteza motora, sin embargo no fue posible correlacionar éstos datos con la cuantificación de catecolaminas.

II. ABSTRACT

Introduction: The most frequent acute cerebral lesions in the adult patient are cerebral vascular disease (CVA) and traumatic brain injury (TBI). It is estimated that more than 30% of these patients develop severe sequelae and up to 50% of them will persist with severe and permanent disability despite having received adequate rehabilitation therapy. Therefore, the development and implementation of new strategies that improve the results of conventional rehabilitation is very important. The current treatment regimens only consider the symptomatic use of some drugs to manage the sequelae of these lesions (spasticity, epilepsy, depression, insomnia, etc.). There is previous experimental and clinical evidence about the positive effects of noradrenergic and dopaminergic modulation on motor recovery. However, there is still insufficient evidence to support the systematic use of dopaminergic and noradrenergic drugs as an adjuvant treatment to neuro-rehabilitation, nor has it clearly established which of these two neurotransmission systems participates most significantly in motor recovery. **Objective:** To demonstrate that the modulation of synaptic plasticity through the administration of levodopa and reboxetine significantly improves motor recovery in rats with a cerebral cortex lesion and to correlate these effects with the levels of dopamine, noradrenaline and its metabolites. **Methods:** Male Wistar rats (280-300g) were used, divided into four groups: the control group (6 rats) and the ferrous chloride-injured groups: FeCl₂ (6 rats), FeCl₂ + L-DOPA 50mg / Kg / day / 10 days (6 rats) and FeCl₂ + Reboxetine 10mg / kg / day / 10 days (6 rats), stereotactic surgery was performed to injure the primary motor cortex, and behavioral performance was then evaluated using 4 behavioral tests: Cylinder, step adjustment, fingerprint and beam walking on three occasions, day 1, 5 and 10 post-injury, the levels of catecholamines were finally measured by HPLC at the end of treatment. **Results:** it was possible to improve the performance of the rats in the tests of adjustment steps, beam walking and footprint test with levodopa and reboxetine, from day 5 of evaluation, a difference between the use of the left forelimb with respect to the right in the cylinder test, which supports the hypothesis raised; with respect to the quantification data of catecholamines, differences between the striatum of the ipsilateral side and the contralateral side in the levels of dopamine, DOPAC, HVA and noradrenaline are observed, however, it is not possible to correlate the behavioral data with catecholamine levels. **Conclusion:** It was possible to modulate the synaptic plasticity through the administration of levodopa and reboxetine independently, achieving motor recovery in rats with a motor cortex lesion, however it was not possible to correlate these data with the quantification of catecholamines.

III. INTRODUCCION

Las lesiones cerebrales agudas más frecuentes en el paciente adulto incluyen a la enfermedad vascular cerebral (EVC) y el traumatismo craneoencefálico (TCE). La EVC es cualquier trastorno en el cual un área del encéfalo es afectada de forma transitoria o permanente por una isquemia o hemorragia, estando uno o más vasos sanguíneos cerebrales afectados por un proceso patológico (Diez-Tejedor *et al*, 2001). La EVC isquémica ocurre por una disminución del aporte sanguíneo cerebral de forma total (isquemia global) o parcial (isquemia focal) que ocasiona una área de necrosis (infarto); mientras que la hemorrágica se da por una irrupción súbita de sangre en el parénquima cerebral, en los ventrículos cerebrales o en el espacio subaracnoideo (Micheli F, *et al*. 2002).

La enfermedad vascular cerebral es un creciente problema de salud en los países que viven la llamada transición epidemiológica. Esto contrasta con lo observado en países desarrollados donde en las últimas cuatro décadas la incidencia de enfermedad vascular cerebral ha disminuido consistentemente, mientras que casi se ha duplicado en países en vías de desarrollo. Este fenómeno parece paralelar con el aumento de la población añosa y con el patrón progresivo de la frecuencia de factores de riesgo de enfermedad aterotrombótica como hipertensión, diabetes, obesidad y dislipidemia, entre otros.

Actualmente las enfermedades cerebrovasculares en México deben considerarse como un problema de salud de orden prioritario. La tendencia registrada durante los últimos años muestra un incremento continuo en la mortalidad por este padecimiento que ocupó en 2010 el sexto lugar dentro de las principales causas de defunción.

En un estudio que realizó el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en 2010 encontró que para el caso de las enfermedades cerebrovasculares existe una tendencia creciente y sostenida que implica un incremento del 27.7% entre 2004 y 2010 (con cerca de 40 mil egresos el primer año vs casi 51 mil para 2010).

El comportamiento según el sexo fue muy semejante en ambos casos (Casares-Cruz K. 2015).

Por otro lado, el TCE es toda lesión o daño ejercido al tejido nervioso por la acción súbita de una fuerza externa. Las lesiones cerebrales en el TCE pueden involucrar contusión, laceración, hematoma intracraneal, lesiones por contragolpe, cizallamiento de fibras nerviosas, hipertensión intracraneal, hidrocefalia y hemorragia subaracnoidea. En México, el TCE es la tercera causa de muerte, que corresponde a muertes violentas y accidentes, con 35,567 defunciones anuales y una mortalidad de 38.8 por 100 mil habitantes, siendo la población más vulnerable la que oscila entre los 15 y 45 años de edad (Micheli F, *et al.* 2002). La importancia de las lesiones cerebrales agudas para la salud pública radica en la mortalidad asociada, pero fundamentalmente en que constituyen la causa más frecuente de discapacidad en población adulta no solo en México sino en el mundo (Diez-Tejedor *et al.*, 2001). Se estima que más del 30% de los sobrevivientes de lesiones cerebrales agudas presentará una discapacidad severa que requerirá de asistencia especializada durante al menos los primeros 3-6 meses posteriores al evento (Bonita et al, 1997; Kelly-Hayes et al, 2003).

IV. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la modulación de la plasticidad sináptica a través de la administración de levodopa y reboxetina mejora significativamente la recuperación motora en ratas con una lesión de la corteza motora.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los efectos de L-DOPA y Reboxetina sobre la recuperación motora en ratas con una lesión cortical, a través de 5 pruebas de conducta motora.
- Conocer si existen diferencias en los efectos mostrados por L-DOPA y Reboxetina sobre la recuperación motora.
- Determinar los cambios que ocurren en los niveles de dopamina, noradrenalina, DOPAC y HVA después de la administración de L-DOPA y Reboxetina sobre la corteza motora primaria, estriado y puente (bilateral)
- Establecer si existe una correlación de estos niveles con sus efectos sobre la recuperación motora.

V. ANTECEDENTES

Las consecuencias o secuelas que producen las lesiones cerebrales agudas en los pacientes resultan muy diversas y de distinta severidad, pero pueden agruparse en las siguientes: a) neurológicas (motoras, sensitivas, sensoriales, del ciclo sueño-vigilia, lenguaje, etc.), b) cognitivas (alteraciones de memoria, atención, aprendizaje, etc.), c) conductuales y de personalidad (apatía, depresión, desinhibición, ansiedad, psicosis, etc.), y d) consecuencias sociales, en su estilo de vida y económicas (pérdida de empleo, dificultad para trasladarse, discriminación, dependencia física y económica, etc.). Todas estas secuelas comprometen de forma muy importante la calidad de vida de las personas que la padecen y de sus familias; pero además genera costos de atención muy elevados para el sistema de salud (Kelly-Hayes et al, 2003). De entre todas estas secuelas, una de las más frecuentes e importantes son las secuelas motoras (paresia, parálisis, espasticidad, rigidez, etc.) que se estima se presentan en más del 40% de los casos (Bonita et al, 1997).

Actualmente el tratamiento de las secuelas de las lesiones cerebrales agudas está enfocado en distintos tipos de rehabilitación: re-educación muscular, fortalecimiento muscular, preservación de los arcos de movilidad, prevención de contracturas, manejo de la espasticidad, rehabilitación del lenguaje y escritura, rehabilitación ocupacional y laboral, así como medidas de fisioterapia (hidroterapia, vibración, ultrasonido, etc.). A pesar de que en la actualidad existen una gran diversidad de abordajes terapéuticos enfocados a la neuro-rehabilitación de estas lesiones, se estima entre el 43-50% de los pacientes persisten con secuelas neurológicas graves a pesar de haber recibido la rehabilitación adecuada, por lo que el desarrollo e innovación de nuevas alternativas de rehabilitación más eficaces para el manejo de las secuelas de las lesiones cerebrales agudas es una prioridad de salud a nivel mundial (Selassie et al 2008).

Se considera que el mecanismo mediante el cual funcionan los distintos tipos de rehabilitación neurológica, es estimulando, facilitando o guiando los

diversos procesos plasticidad cerebral (Freivogel S.,1997). Estos procesos de plasticidad incluyen desde modificaciones moleculares y cambios en la expresión génica, hasta cambios neuroquímicos, en la morfología neuronal, e incluso la reorganización de funciones cerebrales complejas (Selassie et al 2008). En este sentido, la observación en la década de los 80's, de que la estimulación catecolaminérgica experimentalmente mejoraba la recuperación motora en ratas con una lesión cerebral, llevó a sugerir la posibilidad de estimular los procesos de plasticidad cerebral por medio de distintos fármacos (Freivogel S.,1997). Desde entonces diversos estudios tanto experimentales como clínicos han apoyado esta hipótesis (Bueno-Nava A., *et al.* 2010, Tamura Y, *et al.* 2009, Ziemman U, *et al.* 2008). A este respecto dos de los sistemas de neurotransmisión que más se han observado involucrados en la recuperación motora son la neurotransmisión dopaminérgica y noradrenérgica (Meintzschel and Ziemann, 2006, González-Piña R, *et al.* 2006).

En la EVC, así como en otras patologías, existe acumulación de hierro que toma lugar en áreas específicas del cerebro, para lo cual existen diversos modelos animales donde una inyección de hierro en el cerebro se asocia con una lesión oxidante, neurdegeneración y muerte neuronal. Es importante notar que el modelo de inyección con hierro es bien aceptado como un inductor de estrés oxidativo, además de mimetizar los efectos de una hemorragia intracortical debido a la formación de radicales libres inducidos por el hierro contenido en la hemoglobina. Los cambios descritos ocurren bajo condiciones específicas de lesión experimental. En este marco, se ha propuesto que la recuperación de la función motora después de la lesión cortical focal podría acompañar la restauración funcional de grupos de neuronas localizados en regiones que son remotas, pero anatómicamente relacionadas al sitio de lesión (Bueno-Nava *et al.* 2010).

La levodopa o L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina) es un precursor inmediato de dopamina (DA) que atraviesa adecuadamente la barrera hematoencefálica y que requiere de la acción de la Dopa-descarboxilasa de las neuronas dopaminérgicas. Para evitar que la L-DOPA sea convertida a DA en los

tejido periféricos, lo cual se asocia a diversos efectos colaterales, se administra con un inhibidor de la dopa-descarboxilasa (carbidopa o bencerasida) en una relación 1:10. Estudios experimentales en humanos saludables mostraron que la medicación con levodopa así como agonistas de dopamina mejora el desarrollo de la memoria motora (Flöel et al. 2005, Meintzschel and Ziemann, 2006). En un estudio realizado en ratas lesionadas con cloruro ferroso (FeCl_2) en la corteza sensoriomotora, se realizó la prueba de barra de equilibrio 20 días posteriores a la lesión, se encontró un incremento significativo en los niveles de 5-HT en ambos hemisferios, lo cual sugiere una respuesta compensatoria a la excitabilidad neuronal después de la lesión axonal de las terminales serotoninérgicas en la corteza cerebral (Bueno-Nava A., 2010).

Posterior a la lesión cortical, hay una reducción de noradrenalina y otras monoaminas en el cerebro, así como una reducción de receptores noradrenérgicos alfa-1 (Prasad M R., 1994; Dunn-Meynell A. 1994).

La importancia de la noradrenalina (NA) en la recuperación motora se evidencia con estudios que demuestran el incremento de este neurotransmisor por ciertos fármacos. Por ejemplo, antagonistas de receptores adrenérgicos como el alpha-2 (presináptico), yohimbina e idaxozan, éstos incrementan la liberación de noradrenalina; estos agentes, como las anfetaminas, facilitan la recuperación motora cuando se administran en una sola dosis después de una lesión unilateral en la corteza sensoriomotora (Sutton R L, 1992; Irish S L, 1995; Goldstein L B, 1989; Feeney D M, 1988). La desipramina, bloquea la recaptura de noradrenalina y facilita la recuperación de hemiplejía en ratas (Boyeson M G, 1993).

En un estudio realizado en ratas, se examinó el efecto positivo del tratamiento con Reboxetina (un inhibidor selectivo de la recaptura de noradrenalina) en las puntuaciones de inmovilidad y fracaso en la prueba de nado forzado, encontrándose que el tratamiento con éste fármaco disminuyó significativamente los parámetros antes mencionados en dicha prueba de forma dosis-dependiente (Connor T J, 1999).

La reboxetina es un inhibidor selectivo de la recaptura de noradrenalina, incrementa la excitabilidad de la corteza motora y mejora el aprendizaje motor, así como el desempeño en tareas visuomotoras. El desempeño motor de personas con alguna lesión cerebral aguda puede ser mejorado vía estimulación noradrenérgica (Wong *et al.* 2000).

La recuperación de la función neurológica posterior a una lesión cerebral aguda por un tratamiento con levodopa (agonista dopaminérgico) puede involucrar mecanismos de plasticidad neuronal a través de los receptores de dopamina en la corteza motora primaria (Gladston DJ, 2000; Molina- Luna *et al.*, 2009).

Existe evidencia por separado acerca de los efectos positivos de los fármacos con acción dopaminérgica y noradrenérgica, sin embargo, aún no hay evidencia suficiente que apoye la participación preponderante de uno de los dos sistemas en la recuperación motora y menos aún que permita recomendar de forma sistemática la utilización de estos estimulantes en los pacientes con déficit motor por lesiones cerebrales agudas. La L-DOPA y la reboxetina son estimulantes genéricos de estos sistemas de neurotransmisión que además están aprobados para su uso en seres humanos por lo que los resultados obtenidos tendrán más oportunidad de trascender hacia estudios clínicos en el futuro.

VI. METODOLOGÍA

Animales

Se usaron ratas Wistar macho (280-300g), las cuales se mantuvieron en periodos constantes de luz/oscuridad 12h/12h, y a una temperatura ambiental constante de aprox. 20 ± 2 °C y lograron ser habituadas a las condiciones del laboratorio por lo menos una semana previa a la cirugía. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico en un máximo de 5 animales por caja, y recibieron alimento y agua *ad libitum*; durante todo el experimento se procuró utilizar la menor cantidad posible de animales de experimentación y se minimizó el sufrimiento o malestar de los mismos en apego a la *Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación*.

Las ratas fueron donadas por el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El protocolo se clasifica en la categoría D según la clasificación de actividades experimentales de acuerdo al grado de invasión, molestia o daño producido sobre los animales de laboratorio.

Grupos

Los animales fueron asignados de forma aleatoria dentro de 4 grupos:1) Grupo control, a los cuales no se realizó ninguna manipulación estereotáxica 2) Grupo experimental que recibieron lesión con cloruro ferroso (FeCl_2 50 mM, 10 μ l, 1 μ l/min) 3) Lesión con FeCl_2 50 mM, 10 μ l, 1 μ l/min + tratamiento L-dopa 50mg/kg/día v.o y 4) lesión con FeCl_2 50 mM, 10 μ l, 1 μ l/min + tratamiento Reboxetina 30mg/kg/día v.o.

Cirugía estereotáxica y fármacos

La ratas de los grupos que recibieron la administración de cloruro ferroso (FeCl_2) por vía estereotáxica. Los animales fueron previamente anestesiados con

una mezcla de ketamina y xilacina (60mg/Kg y 10mg/Kg respectivamente) según dosis reportadas previamente (Viniestra et al, 2002); para después ser colocadas en el marco estereotáxico, y recibir mediante una jeringa Hamilton (colocada en el soporte del estereotáxico) de 10µL ya sea líquido cefalorraquídeo (LCR) (en mM: 125 NaCl, 3 KCl, 1.3 CaCl₂, 1 MgCl₂ and 2.3 NaHCO₃, pH 7.2) 40µl de cloruro ferroso 50mM, utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas respecto a bregma: anteroposterior (AP) 2mm, lateral (L) 2mm y ventral (V) 2mm respecto a la dura madre. Los fármacos (L-DOPA y Reboxetina) fueron administrados a las 24hrs pos lesión en las dosis ya definidas durante 10 días mediante sonda orogástrica tipo Levin 6-8Fr.

Al final de las evaluaciones conductuales y administración de fármacos se sacrificó a los animales por decapitación para extraer las regiones cerebrales de interés (corteza motora primaria, estriado y puente) y finalmente cuantificar dopamina, noradrenalina, HVA y DOPAC por el método de HPLC.

La decapitación es una técnica para la eutanasia de roedores y conejos pequeños, que se realiza con un aparato diseñado especialmente para este propósito "guillotina". Es un medio para obtener tejidos y fluidos corporales libre de contaminación química y/o tejido cerebral íntegro.

Evaluaciones conductuales

Todas las evaluaciones conductuales se realizaron en los días 1, 5 y 10 posteriores a la cirugía.

La evaluación de actividad motora de todas las pruebas se realizó en una habitación separada de aproximadamente 4 m de largo por 3 m de ancho, con las ventanas recubiertas para evitar la entrada de luz exterior y con aislamiento sonoro. Todas las evaluaciones se realizaron en un horario entre las 9:00 y las 13:00 hrs y en condiciones de baja iluminación artificial.

- *Barra de equilibrio*: En la prueba de barra de equilibrio los animales fueron colocados en una viga de madera (200cm largo x 2cm ancho)

elevada a 45cm del nivel de la mesa del lado contrario a su caja. Los animales fueron entrenados para asegurar que el desempeño durante la evaluación es más estable y se reflejó la coordinación motora en contraposición a la aversión natural del roedor a cruzar espacios no protegidos. Al inicio del entrenamiento, se colocó al animal muy cerca de su caja y éste regresó sin forzar, gradualmente la rata fue colocada más lejos de su caja hasta que ésta regresó recorriendo la viga completa de forma espontánea (la duración del entrenamiento osciló entre los 2 a 5 días). Posterior al entrenamiento la rata mantuvo las 4 patas sobre la viga, cuando se presentó un déficit motor, éste patrón cambió. Para la evaluación cuantitativa del desempeño motor se consideraron cuatro valores, considerando los parámetros mostrados en la tabla siguiente, los cuales fueron sumados para obtener un valor general. Es importante mencionar que los valores más altos, simbolizan mayor déficit motor. (Figura 1) (Brailowsky *et al.*, 1986; Brooks & Dunnett, 2009).

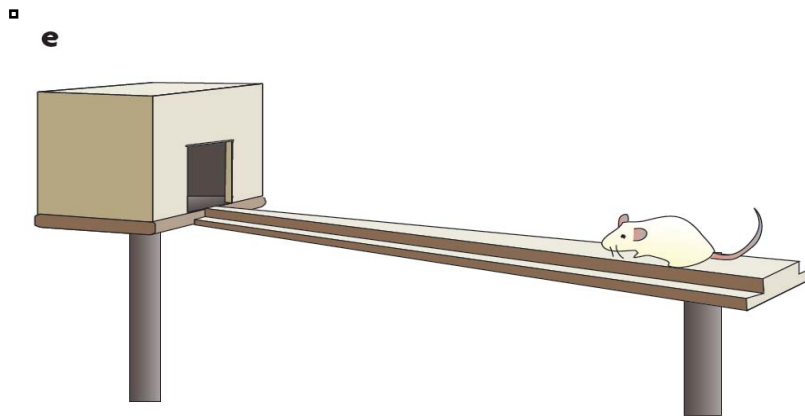


Figura 1. Prueba de barra de equilibrio

Para la calificación de la prueba se tomaron en cuenta los siguientes valores:

Descripción	Escala	Puntaje total
Incapaz de correr	6	6-24
Arrastrando extremidades	5	5-20
Caídas o >3 deslizamientos	4	4-16
>3 deslizamientos y/o 4 dedos fuera de la barra (unilateralmente)	3	3-12
Hipotonía (cojeando)	2	2-8
Base de sustentación más amplia (4 dedos fuera de la barra, bilateralmente)	1	1-4
Sin déficit aparente	0	0

Tabla 1. Evaluación de la barra de equilibrio

- *Prueba de ajuste de pasos.* El ajuste de pasos se realizó sobre una superficie lisa, libre de obstáculos, se tomó a la rata inhabilitando 3 de sus patas, sólo dejando libre una de las extremidades anteriores, a continuación se inclinó a la rata hacia el lado de la pata libre y se arrastró con un movimiento lateral lento y continuo, de forma que el animal se vio obligado a efectuar pasos “de ajuste” para compensar el movimiento lateral; se realizó a todo lo largo de una superficie de 2 metros, con ambas extremidades anteriores en 4 repeticiones por lado. Se contabilizó el número promedio de pasos ajustados por cada extremidad en las 4 repeticiones, se saca el promedio de ajustes realizados durante la evaluación para su análisis. El movimiento realizado en ésta prueba es obligado (Brooks & Dunnett, 2009) (Figura 2).



Figura 2. Prueba de ajuste de pasos

- *Prueba del cilindro.* En la prueba del cilindro se introdujo a cada rata durante 5 minutos en un cilindro de acrílico transparente, durante éste tiempo se tomaron en cuenta las veces que la rata de forma espontánea toca la pared del cilindro al levantarse con las extremidades anteriores, ya sea derecha, izquierda o ambas. Ésta prueba muestra el desempeño motor espontáneo y la preferencia de utilización de alguno de los miembros anteriores (Brooks & Dunnett, 2009) (Figura 3)

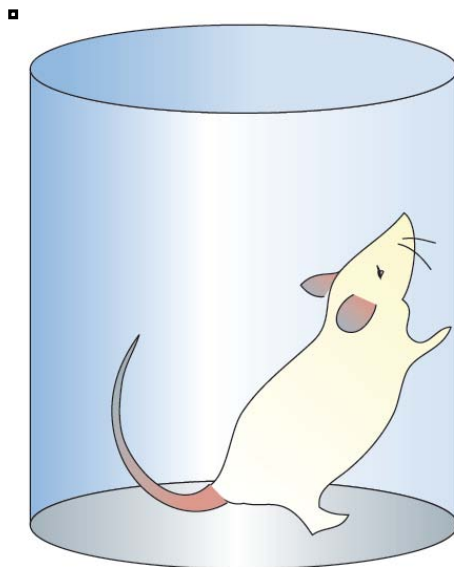


Figura 3. Prueba del cilindro

- *Prueba de impresión de huellas.* Para la prueba de impresión de huellas se requirió de un entrenamiento de los animales, el primer día se introdujo durante 5 minutos a la rata en la caja con piso metálico y la puerta de salida cerrada; el segundo día se introdujo a la rata por 5 minutos en la misma caja, pero con la puerta abierta, de forma que pudiera desplazarse a lo largo del túnel hasta la caja de salida (sin piso metálico, fue el refugio de los animales); al tercer día se introdujo a la rata en la caja de piso metálico y ésta recorrió todo el túnel, si no realizaba éste movimiento, se le aplicaba una descarga eléctrica de 65v, de forma que se le obligó a dirigirse a la caja de refugio, se realizó ésta operación durante los 5 minutos de entrenamiento; al cuarto día se aplicó el mismo procedimiento que en el día 3, el entrenamiento se consideró terminado cuando el animal fue capaz de hacer dos recorridos sin necesidad de descargas eléctricas. Para la evaluación se entintaron de colores distintos las patas anteriores y posteriores antes de someter a los animales a la prueba. Se tomaron en cuenta tres parámetros a evaluar: la longitud de la zancada, el ancho y el ángulo de la misma (Brooks & Dunnett, 2009) (Figura 4)

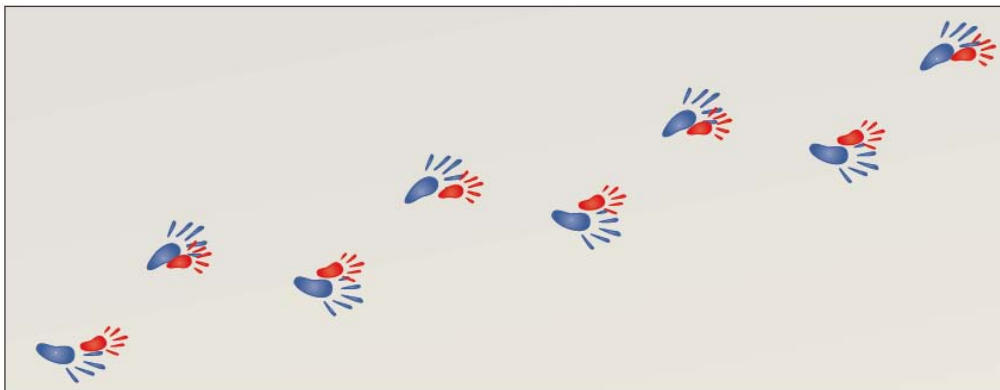


Figura 4. Prueba de impresión de huellas.

Pruebas neuroquímicas

Posterior a las evaluaciones conductuales, se sacrificó a los animales con ayuda de una guillotina de forma rápida para evitar estrés y sufrimiento en las ratas, se preservó la región cerebral de interés (estriado) en solución antioxidante a -70° hasta la determinación de neurotransmisores por el método de cromatografía líquida de alta eficacia, el cual se realizó en un equipo de HPLC acoplado a un detector electroquímico. Las condiciones de detección fueron las siguientes: una celda analítica con potenciales $=+350\text{mV}$, $E1=200\text{mV}$ y $E2=-200\text{mV}$, además se utilizó una columna para catecolaminas (Alltech, adsorbosphere Catecollamine 100x 4.6 mm, tamaño de la partícula $3\mu\text{m}$) usando un flujo de 1.6ml/min para cuantificar los niveles de dopamina, noradrenalina, HVA y DOPAC en estriado (bilateral),

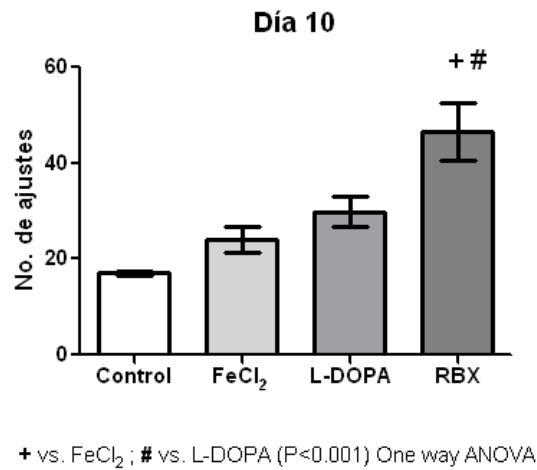
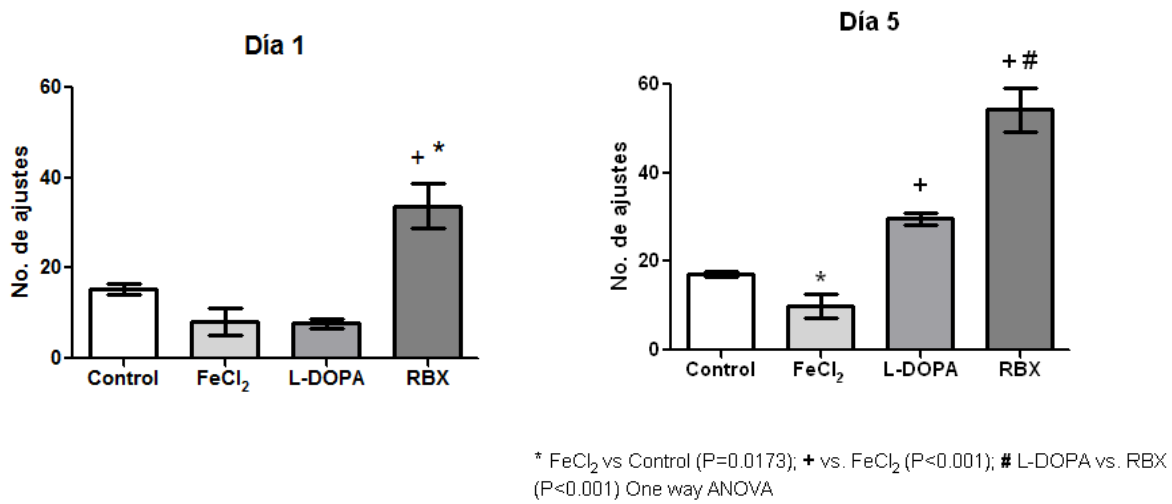
VII. RESULTADOS

Ajuste de pasos

Para todos los datos obtenidos a partir de las pruebas conductuales, así como la cuantificación de catecolaminas, se realizaron pruebas de normalidad de datos para posteriormente realizar las pruebas estadísticas correspondientes.

La prueba de ajuste pasos se representa a partir del número de ajustes que realizó cada grupo de animales, se analizaron los datos por medio de ANOVA de una vía; éste análisis mostró un desempeño deficiente en los grupos de lesión con cloruro ferroso sin tratamiento (experimental) y el tratado con levodopa respecto al control; sin embargo el grupo tratado con reboxetina muestra un efecto positivo en el desempeño de ésta prueba durante la primera evaluación (día 1 de administración de fármacos).

La segunda evaluación (día 5 de administración de fármacos) de la prueba de ajuste de pasos, reveló que el grupo tratado con levodopa mejoró su desempeño en ésta tarea, mientras que el grupo de reboxetina incrementó de manera significativa su recuperación respecto al grupo de levodopa. Finalmente, la tercera evaluación arrojó un resultado inesperado del grupo experimental, el cual mejora su ejecución incluso, respecto al grupo control. Los grupos tratados con fármacos mantuvieron sus valores positivos.



Gráfica 1. Prueba de ajuste de pasos, las barras muestran el promedio + la D.E de un grupo de 6 animales, * p<0.0173 vs control; + vs FeCl₂; # p<0.001 vs L-DOPA, análisis ANOVA de una vía.

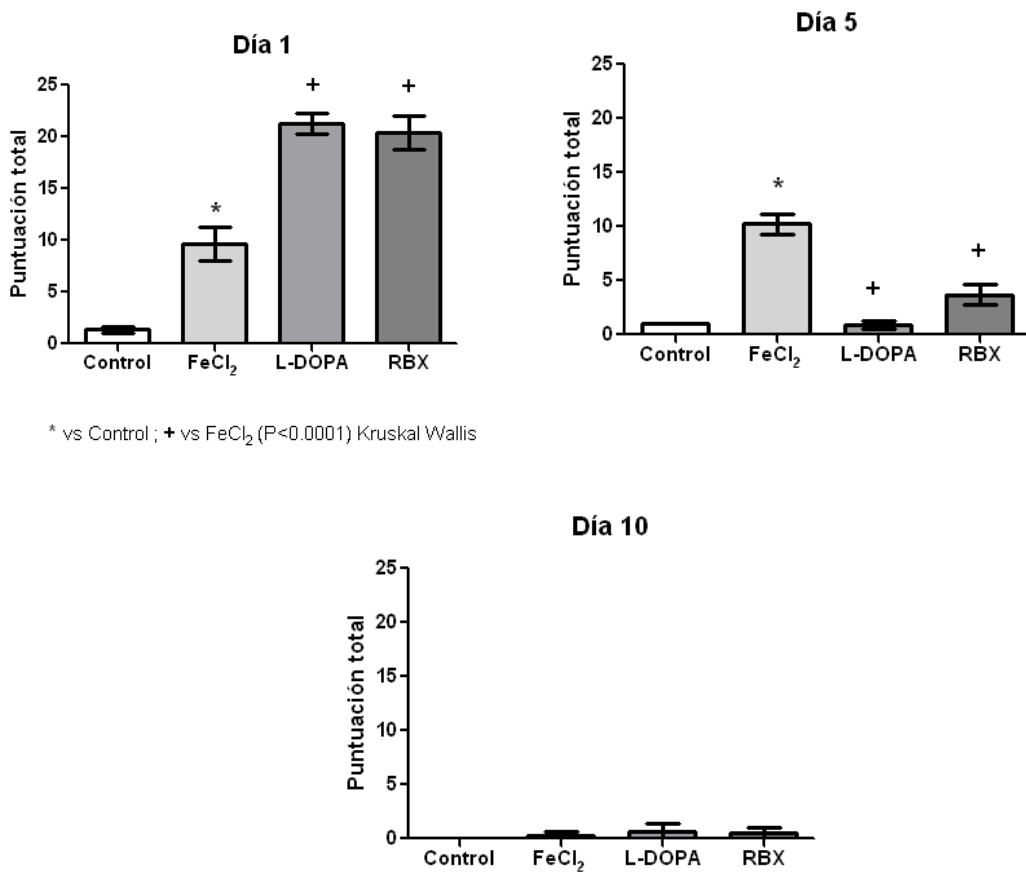
Barra de equilibrio

El análisis correspondiente para la prueba de barra de equilibrio, posterior a las pruebas de normalidad fue Kruskal-Wallis. Para éste estudio se tomaron los valores totales de la evaluación de la marcha sobre una viga de madera elevada, donde los datos altos representan deficiencia en la ejecución del examen.

La primera valoración evidenció al grupo experimental como a los grupos tratados farmacológicamente con bajo desempeño; sin embargo, los grupos administrados con levodopa y reboxetina exhibieron valores más alterados que el grupo lesionado.

La segunda evaluación realizada al día cinco de tratamiento, muestra una clara reducción del puntaje en la barra de equilibrio, lo cual indica que el tratamiento con fármacos mejoró de forma significativa el rendimiento de los grupos pertenecientes a levodopa y reboxetina.

En la tercera evaluación, efectuada al día diez de tratamiento, todos los grupos se encuentran con valores similares a los del grupo control, es decir, no muestran afectación de la extremidad previamente lesionada.

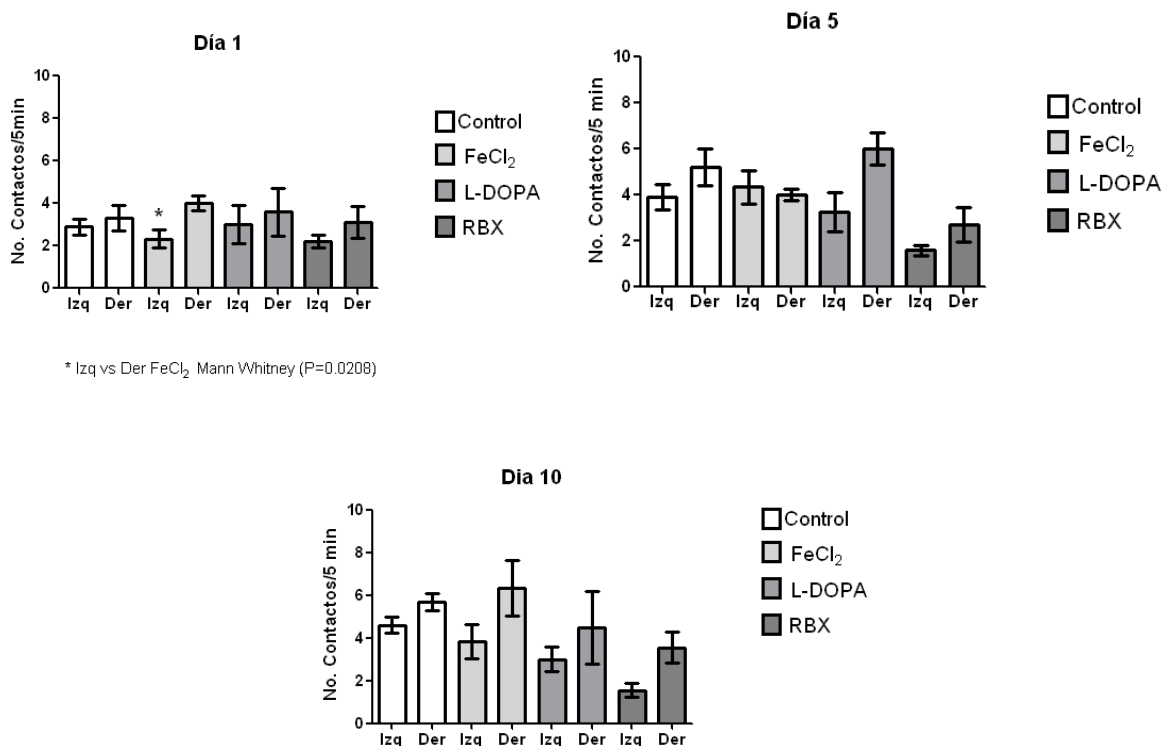


Gráfica 2. Prueba barra de equilibrio, las barras representan el promedio + la D.E de un grupo de 6 animales, *p<0.001 vs control; + p<0.001 vs FeCl₂, análisis estadístico Kruskal-Wallis.

Cilindro

La tercer prueba realizada sobre desempeño motor, el cilindro, proporciona información sobre la actividad de los miembros anteriores de los objetos de estudio, contabilizando el número de contactos durante cinco minutos dentro del instrumento de evaluación; el análisis estadístico posterior, que corresponde a la prueba de normalidad fue U de Mann Whitney, el cual reveló en el día primero de evaluación, la afectación del miembro anterior izquierdo; la cual, a pesar de no ser significativa mas que en el grupo lesionado con cloruro ferroso, da muestra de la preferente utilización del miembro anterior no afectado.

La segunda y tercer evaluación arrojan datos diversos y nada concisos respecto a la preferente utilización de los miembros anteriores, de lo cual se puede rescatar que los grupos de tratamiento farmacológico se observan menos activos que el resto y con la preferente utilización del miembro no afectado.



Gráfica 3. Prueba cilindro, las barras representan el promedio + la D.E de un grupo de 6 animales, $p < 0.005$ * izquierda vs derecha de FeCl₂, análisis estadístico U de Mann Whitney.

Impresión de huellas

El último instrumento de desempeño motor, la impresión de huellas, proporcionó tres variables cuantificables que ofrecen valiosa información de espacio-temporalidad en la marcha; el largo, ancho y ángulo de la zancada fueron analizados por ANOVA de una vía.

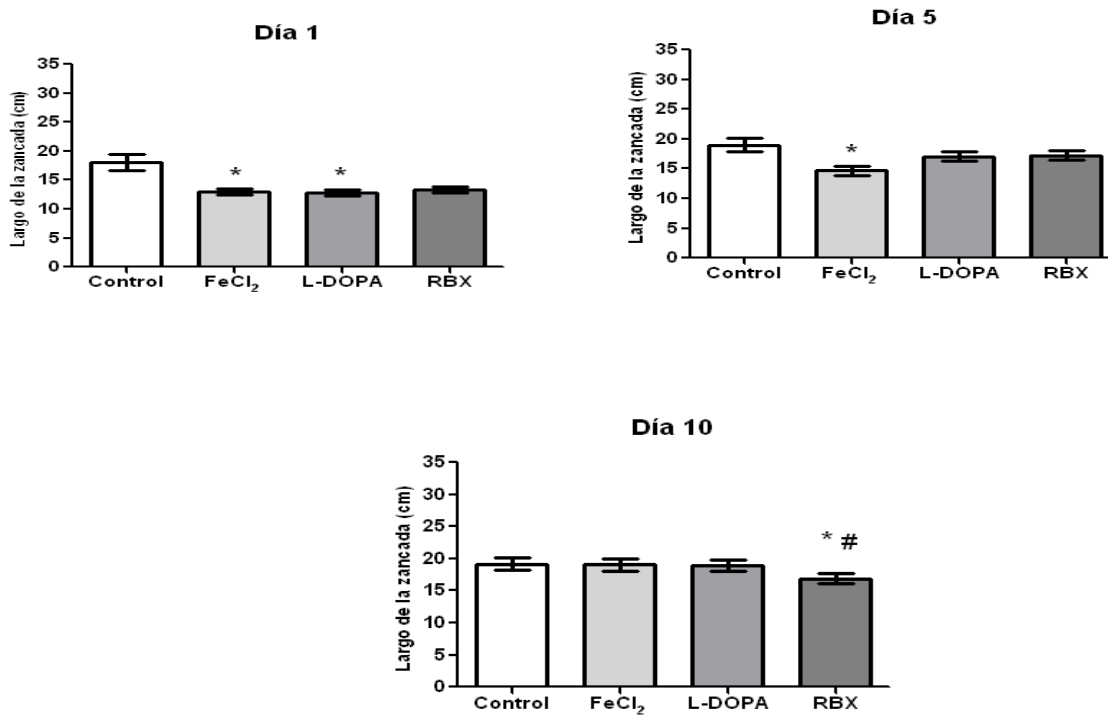
La primer evaluación para la variable “largo de la zancada”, demuestra una clara reducción para los grupos lesionado y administrados con fármacos, haciéndose significativa ésta reducción en los grupos lesionado y levodopa. En la segunda evaluación, el grupo lesionado mantiene la reducción del largo de su zancada, sin embargo, los grupos con tratamiento, modifican éste parámetro acercándose a los valores del grupo control, los cuales no son significativos.

La tercer evaluación muestra al grupo control, lesionado y de levodopa con valores homogéneos, lo cual no pasa con el grupo de reboxetina, es decir, no modifica el largo de su zancada respecto a los otros grupos.

El parámetro “ancho de la zancada” en su primer día de evaluación tiene modificaciones en los grupos con lesión y con tratamiento farmacológico, siendo significativa ésta reducción sólo en los grupos lesionado y levodopa; para la segunda muestra de desempeño motor, el grupo lesionado mantiene afectado éste parámetro y los grupos de tratamiento modifican el ancho de la zancada muy cercano al grupo control, sin embargo no es significativo. Los datos finales de la prueba muestran datos homogéneos en todos los grupos, lo cual indica que, tanto los grupos lesionado y en tratamiento han recuperado el ancho de su zancada.

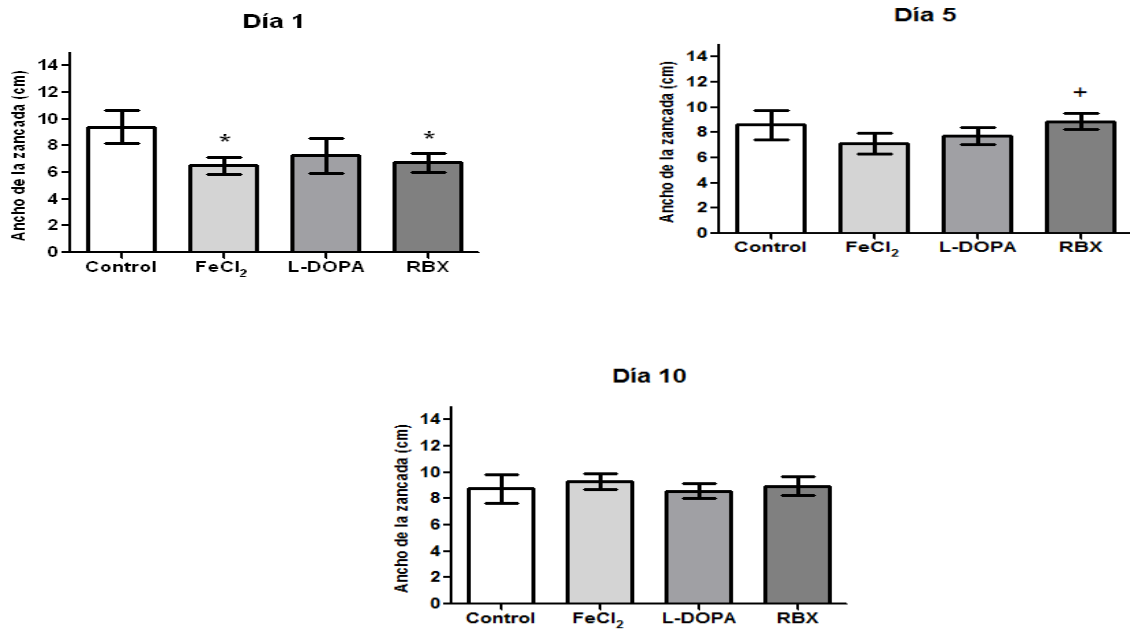
El ángulo de la zancada durante la primera evaluación se observa modificada en los grupos experimental y tratados con fármacos, los cuales muestran un ángulo mayor a diferencia del grupo control; en la segunda observación, se logra apreciar una reducción de éste parámetro en los grupos levodopa y reboxetina de manera significativa, por otro lado, se observa el grupo lesionado con valor muy similar al del grupo control, para la tercera evaluación todos los grupos obtienen los mismos valores, siendo significativa ésta diferencia en el grupo de levodopa comparado con el grupo lesionado.

Largo de la zancada



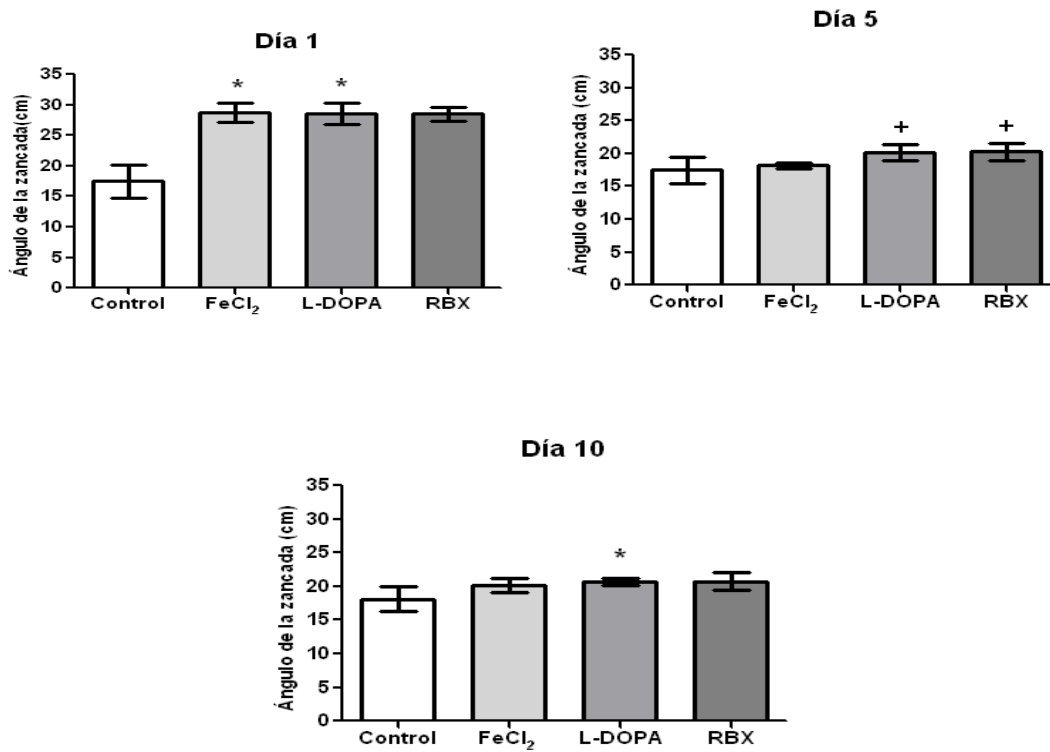
Gráfica 4. Impresión de huellas (largo de zancada), las barras representan el promedio \pm la D.E de un grupo de 6 animales, * $p < 0.005$ vs Control; # $p < 0.005$ vs L-DOPA, análisis estadístico ANOVA de una vía.

Ancho de la zancada



Gráfica 5. Impresión de huellas (ancho de zancada), las barras representan el promedio + la D.E de un grupo de 6 animales, * $p < 0.005$ vs control; + $p < 0.005$ vs FeCl₂, análisis estadístico ANOVA de una vía.

Ángulo de la zancada



Gráfica 6. Impresión de huellas (ángulo de zancada), las barras representan el promedio + la D.E de un grupo de 6 animales, * $p < 0.005$ vs control; + $p < 0.005$ vs FeCl₂, análisis estadístico ANOVA de una vía.

Catecolaminas

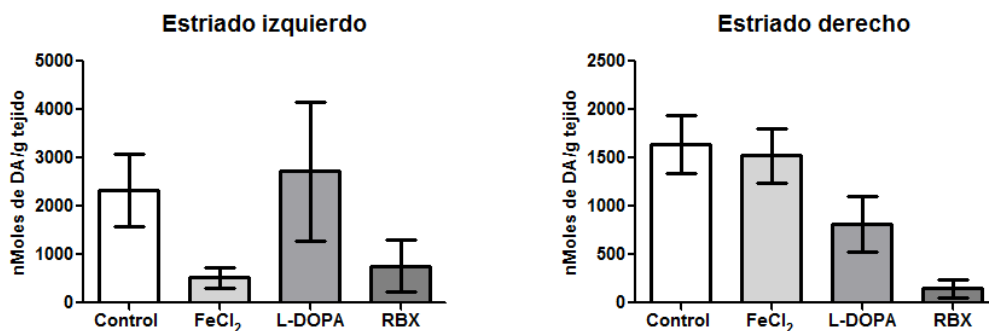
Finalmente, se realizó la cuantificación de catecolaminas y sus metabolitos en tejido estriatal total al término del tratamiento farmacológico en todos los grupos. En el caso de dopamina, los niveles en el estriado izquierdo (lado contralateral a la lesión) se observan reducidos en los grupos lesionado y reboxetina comparados con el grupo control, sin embargo, el grupo de levodopa muestra valores ligeramente más elevados respecto al control, sin llegar a ser significativa ésta diferencia. Respecto al lado derecho lesionado, los niveles de dopamina están reducidos en los grupos de levodopa y reboxetina, sin encontrarse diferencias significativas.

En cuanto a los niveles del metabolito DOPAC en el estriado izquierdo, los grupos lesionados y reboxetina, se encuentran disminuidos en comparación con el grupo control, lo cual no ocurre con el grupo de levodopa, que presenta los niveles más altos, incluso que el control; en contraste, el estriado derecho sólo muestra niveles reducidos de éste metabolito en el grupo de reboxetina, sin embargo, no hay diferencias significativas, sólo se observan tendencias.

Los resultados del análisis para noradrenalina, en el estriado izquierdo se observa disminución de éste neurotransmisor en los grupos lesionado y reboxetina, por otro lado, el grupo de levodopa muestra niveles más altos que los primeros, sin llegar a ser como los del grupo control; en el estriado derecho, se obtienen las mismas observaciones.

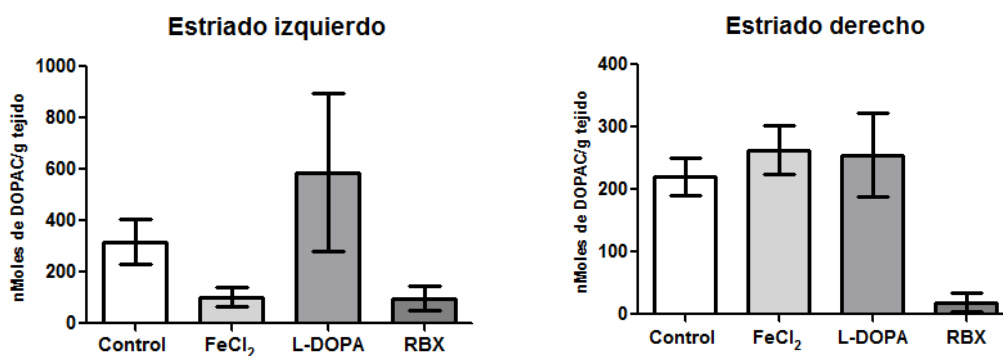
Finalmente, el análisis del lado izquierdo para el metabolito HVA manifiesta una reducción del mismo en todos los grupos, excepto, levodopa, el cual mantiene muy altos sus niveles, respecto al control y todos los grupos; el lado derecho muestra el mismo comportamiento.

Dopamina



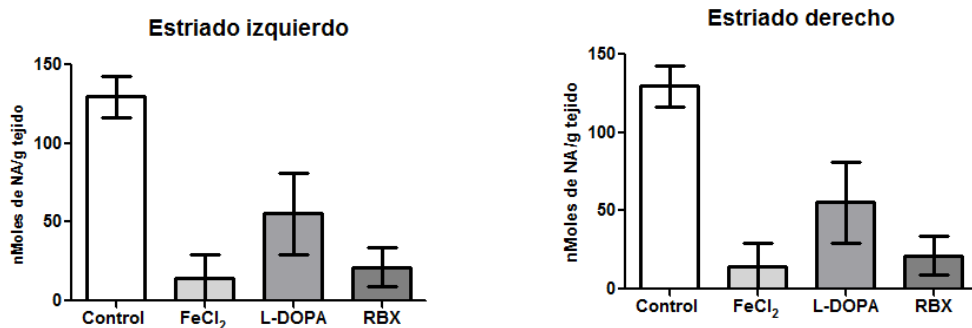
Gráfica 7. Cuantificación de catecolaminas en estriado (niveles de DA), las barras representan la media + D.E de un grupo de 4 animales, análisis estadístico Kruskal-Wallis.

DOPAC



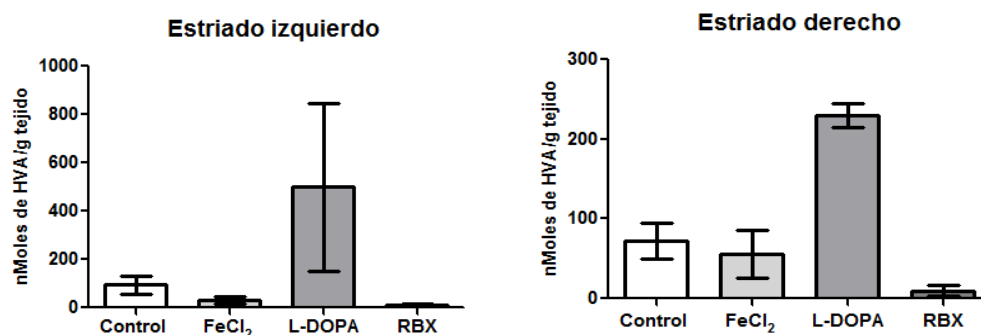
Gráfica 8. Cuantificación de catecolaminas en estriado (niveles de DOPAC), las barras representan el promedio + la D.E de un grupo de 4 animales, análisis estadístico Kruskal-Wallis.

Noradrenalina



Gráfica 9. Cuantificación de catecolaminas en estriado (niveles de NA), las barras representan el promedio + la D.E de un grupo de 4 animales análisis estadístico Krukal-Wallis.

HVA



Gráfica 10. Cuantificación de catecolaminas en estriado (niveles de HVA), las barras representan el promedio + la D.E de un grupo de 4 animales análisis estadístico Krukal-Wallis.

VIII. DISCUSIÓN

La enfermedad vascular cerebral (EVC) es un síndrome clínico caracterizado por el desarrollo súbito de signos neurológicos focales, sin otra causa aparente que el origen vascular (López A, *et al.*, 2001). La EVC se clasifica en dos subtipos: isquémica y hemorrágica. La isquemia es la consecuencia de la oclusión súbita de un vaso arterial y puede tener manifestaciones transitorias (ataque isquémico transitorio) o permanentes, lo que implica un daño neuronal irreversible. La hemorragia intracerebral es la ruptura de un vaso que da lugar a una colección hemática en el parénquima cerebral o en el espacio subaracnoideo (Strong K, *et al.* 2007).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la EVC constituye la segunda causa de muerte global, lo cual representa el 9.7% de la población mundial, de las cuales 4.95 millones de casos que ocurren en países con ingresos medios y bajos (Alwan A, 2010). Su tasa de recurrencia a dos años va del 10 al 22%, pero puede reducirse hasta en 80% con la modificación de factores de riesgo (Kolominsky-Rabas P, *et al.* 2001). De no existir intervenciones de prevención adecuadas, se calcula que para el año 2030, su incidencia incrementará hasta 44% (Strong K, *et al.* 2007). Datos de la Secretaría de Salud de México muestran que en nuestro país la tasa de mortalidad por EVC se ha incrementado a partir del año 2000 particularmente en personas menores a 65 años (Chiquete E., *et al.*, 2011), donde el 45% de los pacientes que sufren una enfermedad vascular cerebral fallece, mientras que el 50% de los pacientes que sobreviven, evolucionan con secuelas severas e irreversibles (Arauz A y Ruiz-Franco A., 2012). Dentro de las secuelas más frecuentes con las que permanecen los pacientes se encuentran las motoras (hemiplejía) en más del 70% de los casos, la cuales son tratadas con distintos métodos de neurorehabilitación, sin embargo, hasta la fecha aún existe poca evidencia sobre la terapia de estimulación farmacológica como adyuvante a las distintas estrategias de rehabilitación.

En este momento, existe evidencia tanto básica como clínica sobre los efectos de la estimulación dopaminérgica y noradrenérgica en la recuperación

motora (Molina-Luna *et al.*, 2009; Scheidtmann K, *et al.*, 2001; Ruscher K, *et al.*, 2012; Wang L E *et al.*, 2011; Zittel S, *et al.*, 2007), sin embargo, dado que existe evidencia de efectos positivos con ambos tratamientos, aun no se conoce con precisión cuál de estos dos sistemas participa de manera más significativa en la recuperación motora, y no existen estudios en los que se hayan comparado ambos tipos de tratamientos. Adicionalmente, la mayoría de los estudios han sido realizados en modelos de isquemia o en pacientes con EVC isquémica (Zhu HF, *et al.*, 2010, Li J *et al.*, 2008, Zhao C, *et al.*, 2009, Puentes S, *et al.*, 2012), existiendo poca evidencia sobre sus efectos en EVC hemorrágico o modelos de hemorragia cerebral.

El objetivo del presente trabajo fue estimular farmacológicamente la vía dopaminérgica usando un precursor de dopamina (levodopa) y paralelamente estimular la vía noradrenérgica, usando un inhibidor de la recaptura de la noradrenalina (reboxetina), en un modelo de lesión oxidante de la corteza cerebral que simula una hemorragia subaracnoidea, evaluar su desempeño motor y finalmente medir los cambios que ocurren en las catecolaminas estriatales al finalizar cada tratamiento.

De acuerdo a los hallazgos en las pruebas motoras, con la administración de ambos fármacos de forma paralela, se lograron observar cambios significativos en las pruebas de barra de equilibrio, ajuste de pasos e impresión de huellas.

La prueba de ajuste de pasos es una prueba de movimiento forzado, descrita inicialmente como herramienta de recuperación motora en modelos de Parkinson en ratas (Chang JW, *et al.* 1999). Aquí se obliga a los animales a desplazarse en una superficie plana a lo largo de 1m, se limita el movimiento de uno de los miembros anteriores y se le obliga a desplazar el miembro libre, contando el número de veces que realiza dicho movimiento.

Existe evidencia clínica tanto en pacientes sanos (Metzger, *et al.* 2015) como en pacientes hemiparéticos (Wang LE, *et al.* 2011) y pacientes con una EVC crónica (Zittel S, *et al.* 2007) quienes recibieron tratamiento farmacológico mediante reboxetina (estimulación noradrenérgica) que mejoraron su desempeño motor en tareas finas como fuerza de prensión o golpeteo de dedos con efecto a

corto plazo mediante el reordenamiento de las interacciones corticales, lo cual apoya los resultados del presente estudio. Por otro lado, también hay evidencia experimental en primates no humanos (Barbay S, *et al.* 2006) y roedores con lesiones corticales, que fueron estimulados farmacológicamente en la vía noradrenérgica (Bueno-Nava, *et al.* 2008; Bueno-Nava *et al.* 2010; Boyeson y Feeney.1989) que mostraron mejor desempeño motor.

La prueba de barra de equilibrio, evalúa la capacidad de los roedores para mantener el equilibrio a través de una viga angosta, se puede medir déficit, coordinación y balance motor, en los resultados para ésta prueba se observó que en el día uno de evaluación los tres grupos que habían sido lesionados mostraban una puntuación más alta (mayor déficit motor) respecto del grupo control, incluyendo a los grupos administrados con fármacos exhibiendo una mayor afectación motora. Debido a que esta primera evaluación se realizó 30 minutos después de ser administrado el tratamiento con los fármacos, esto podría confirmar el efecto adverso de los fármacos.

En cuanto a los efectos secundarios de reboxetina que podrían afectar el rendimiento de los objetos de estudio para dicha prueba, se encuentran; mareo, ansiedad, agitación, o hipotensión dependiente de la dosis (Stahl, S M. 2011). Por otro lado, los efectos secundarios de la levodopa que afectan el desempeño para la prueba son los siguientes: discinesias, movimientos coreiformes, distónicos y otros involuntarios, depresión, demencia y el exceso de sueño; (Merck Canada Inc, 2014)

Posteriormente se observa una disminución significativa en la puntuación de ésta prueba en ambos grupos de tratamiento, sugiriendo una recuperación del desempeño motor, lo cual apoya el propósito de éste trabajo.

La barra de equilibrio es una prueba ampliamente utilizada para evaluar la coordinación motora y equilibrio en general, ha demostrado ser sensible a una diversidad de modelos de lesión cerebral como las lesiones isquémicas (Urakawa S, 2007; Li J *et al.*, 2008; Zhao C, *et al.*, 2009; Zhu HF, *et al.*, 2010), depleción dopaminérgica (Kompolti K, *et al.*, 2010) y otras lesiones de la corteza motora (González-Piña R, *et al.*, 2003; Bueno-Nava A, *et al.*, 2008, Bueno-Nava A, *et al.*,

2010), sin embargo es una prueba que no permite evaluar las alteraciones motoras asimétricas, por lo cual es importante complementarla con alguna otra prueba de desempeño motor sobre la utilización asimétrica de las extremidades (ajuste de pasos, cilindro, escalera de Montoya, etc).

En el grupo del Dr. Antonio Bueno se han realizado estudios donde se muestra el desempeño de los roedores en la barra de equilibrio posterior a una lesión oxidante en el espacio subaracnoideo, las evaluaciones se realizaron a diferentes tiempos (1-20 días), donde encontraron que las ratas muestran un mejor desempeño a partir del día 6 de evaluación, lo cual sugiere una recuperación espontánea. Al compararlo con los resultados obtenidos en este trabajo, sugiere que los fármacos no tuvieron ningún efecto sobre la recuperación motora en ratas lesionadas con FeCl_2 , sin embargo, no se cuenta con el mismo número de ratas evaluadas y las pruebas estadísticas realizadas fueron no normales.

La prueba de cilindro está diseñada para evaluar asimetría motora en modelos con roedores de desórdenes en el sistema nervioso central, ésta prueba también nos permite investigar las bases neurales del comportamiento motor y espacial, así como proveer una vía para evaluar el uso espontáneo de los miembros anteriores de roedores, además de ser una prueba que no requiere de entrenamiento previo. Los animales con lesión cerebral unilateral mostrarán una asimetría en el uso de extremidades durante la exploración vertical. Ésta prueba es objetiva, fácil de usar y medir, sensible para déficit crónicos que otras pruebas no detectan, además de tener una alta confiabilidad (Schaar K L *et al*, 2010).

Ésta prueba proporciona información doble; por un lado, la conducta exploratoria, donde se encuentran involucradas variables como el tiempo y el número de movimientos totales que realiza el sujeto de estudio; por otro lado, se ve reflejado el uso de los miembros anteriores, donde la variable a cuantificar es el número de contactos contralaterales en relación a los contactos bilaterales a la lesión, lo cual se representa como un porcentaje de utilización.

El desempeño en éste instrumento de evaluación motora proporcionó información sobre la asimetría y el porcentaje de utilización de los miembros

anteriores de ratas. El número de contactos realizados en el día uno post-lesión, se ve afectado de forma significativa en el grupo lesionado en el lado contralateral a la lesión, mientras que los grupos tratados con levodopa o reboxetina sólo muestran una tendencia a éste parámetro.

En cuanto al porcentaje de utilización no se observan cambios en los grupos tratados con alguno de los fármacos comparados con el grupo control y de cloruro ferroso.

La prueba de cilindro a pesar de ser una prueba muy sensible en ratas, sin embargo, debería ser usada sólo en modelos de ratones con isquemia focal, cuando el daño cerebral es relativamente severo. El daño unilateral a la corteza sensoriomotora, el tracto corticoespinal y el estriado, puede provocar asimetría crónica del miembro anterior en ratas y ratones, lo cual es algo comparable al desuso que se puede desarrollar en algunos pacientes con accidente cerebrovascular. Ésta prueba también puede ser llamada prueba de asimetría espontánea, Es una prueba relativamente fácil pero que consume mucho tiempo y que puede usarse para evaluar las asimetrías de uso de extremidades post EVC en ratones (Balkaya, *et al.* 2013).

En un modelo de lesión cerebral isquémica, se logró observar un cambio en el porcentaje de utilización del miembro anterior lesionado, posterior a un trasplante de células madre embrionarias de humano, en este mismo trabajo se cita un trabajo previo del mismo grupo, donde se trasplantaron células de fibroblastos dérmicos a ratas con una lesión isquémica, en el cual no se encuentra mejoría en el déficit motor (no se publicaron los resultados) (Daadi M M, *et al.*, 2008)

La prueba de impresión de huellas o análisis de la marcha ayuda a comprender la locomoción de forma más específica, es sensible a los cambios relacionados con lesión, enfermedad o rehabilitación. Es utilizada como una medida de progreso en seres humanos sometidos a rehabilitación.

Ésta prueba se modificó en sus tres parámetros evaluados (largo, ancho y ángulo de la zancada), donde los grupos de levodopa y reboxetina se observan reducidos en los dos primeros parámetros, mientras que el ángulo de la zancada, se ve incrementado; sin embargo, el tratamiento farmacológico modifica el

desempeño en la marcha muy cercano al del grupo control, lo cual da soporte al propósito inicial del presente estudio. Éstas observaciones se reproducen de un trabajo realizado previamente por Bueno-Nava, *et al.* 2010, el cual utiliza el mismo modelo de lesión cerebral y observa un importante desempeño de la vía noradrenérgica en la recuperación funcional motora a través de dos pruebas: barra de equilibrio e impresión de huellas y donde se asocia ésta modificación de la marcha a la atáxica, puesto que se indujo la pérdida de neuronas y axones en el sitio de la lesión e indican el daño en la conectividad cerebelo-espinal y espino-cerebelar (Crawley J, 1999 y Garwicz m, 2002) .

En cuanto a la cuantificación de catecolaminas se logra observar un incremento en la cuantificación total de dopamina, noradrenalina, así como de sus metabolitos en el lado contralateral al lesionado, lo cual corresponde con estudios previos (Martín A, *et al.* 2013), donde las estimulación dopaminérgica manifiesta un incremento en el lado contralateral al lesionado en un modelo de lesión isquémica y se logra observar una mejoría en el desempeño motor, demuestran una importante participación de ésta vía de manera cualitativa (imágenes de Tomografías por emisión de positrones (PET) y cuantitativa (volumen ocupado por isótopos radioactivos).

La dopamina regula muchos aspectos de función neural, incluyendo excitabilidad, transmisión sináptica, plasticidad, tráfico de proteínas y transcripción de genes. El rol de éste neurotransmisor en el movimiento ya es bien establecido: las terminales dopaminérgicas en la corteza motora contribuyen a plasticidad cortical, y en efecto son necesarias para aprender habilidades motoras. Los fármacos dopaminérgicos pueden influenciar indirectamente la recuperación motora post-EVC, a través de su actividad en cualquiera de los diferentes sistemas neurales no motores (Cramer SC. 2015)

La neurotransmisión noradrenérgica amplía la actividad neuronal, incrementa en nivel general de excitabilidad, y selectivamente amplifica las actividades evocadas por aferencias inesperadas (Cramer SC. 2015).

Finalmente podemos decir que reboxetina no tiene efecto en el estriado sobre los niveles de dopamina, DOPAC y HVA, puesto que no modifica la

transmisión dopaminérgica, además de que sólo se observaron los niveles de catecolaminas en estriado.

Dentro de las limitantes en este trabajo se encuentra la edad de las ratas, ya que, el modelo fue realizado en ratas adulto jóvenes, lo cual no ocurre en una enfermedad vascular cerebral en pacientes humanos; por otro lado, la cuantificación de catecolaminas se realizó en tejido total al finalizar todo el proceso experimental, lo cual no permitió observar los cambios en la cuantificación de catecolaminas a lo largo del proceso experimental.

IX. CONCLUSIÓN

El presente trabajo logró acelerar el desempeño motor de ratas con un lesión previa hemorrágica subaracnoidea por medio de dos vías de estimulación, por un lado la estimulación dopaminérgica con levodopa y por otro lado, la vía noradrenérgica con reboxetina. La administración de levodopa y reboxetina durante 10 días mejoró significativamente la conducta motora y la utilización de extremidades anteriores respecto del grupo lesionado, con un efecto más precoz y significativo, la administración de reboxetina se manifestó respecto a levodopa. Se logró observar que el tratamiento con levodopa provoca un incremento en los niveles de dopamina y sus metabolitos (HVA y DOPAC) principalmente en el estriado contralateral. Por lo tanto, esta evidencia preclínica sugiere que la estimulación noradrenérgica con reboxetina puede representar en el futuro una alternativa como terapia adyuvante en la rehabilitación motora de pacientes con secuelas de EVC.

Para futuros ensayos, podrían estimularse la vía dopaminérgica y noradrenérgica de manera simultánea, por medio de la administración farmacológica de levodopa y reboxetina para observar si existe un efecto facilitador del desempeño motor en ratas con una lesión hemorrágica; así también realizar la cuantificación de catecolaminas con ayuda de microdiálisis y realizar otras evaluaciones motoras que pueda ofrecer información complementaria a las ya realizadas.

Cabe señalar la escasa información que se maneja respecto al tema de hemorragia subaracnoidea, para lo cual éste trabajo aporta información útil y novedosa que puede impulsar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el desempeño motor post-EVC hemorrágico.

X. LITERATURA CITADA

1. Alwan A. 2011. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva. World Health Organization
2. Arauz A y Ruiz-Franco A. 2012. Enfermedad vascular cerebral. Rev Fac Med UNAM., 55:3, p. 11-21.
3. Balkaya M, Kröver J M, Rex A y Endres M. 2013 . Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 33:330-338
4. Barbay S, Zoubina E V, Dancause N, et al. A single injection of D-amphetamine facilitates improvements in motor training following a focal cortical infarct in squirrel monkeys. Neurorehabil Neural Repair 2006;20:455–458.
5. Beltran EJ, Papadopoulos CM, Tsai SY, Kartje GL, Wolf WA. 2010. Long-term motor improvement after stroke is enhanced by short-term treatment with the alpha-2 antagonist, atipamezole. Brain Res. 1346:174– 182. doi: 10.1016/j.brainres.2010.05.063.
6. Bonita, R., Broad, J.B., Beaglehole, R. 1997. Ethnic differences in stroke incidence and case fatality in Auckland, New Zealand. *Stroke* 28: 758-761.
7. Boyeson M.G y Feeney D.M. 1989. Intraventricular Nore- pinephrine facilitates motor recovery following sensorimotor cortex injury, *Pharmacol Biochem & Behav* 35, 497– 501.
8. Boyeson M G, Harmon R L. 1993. Effects of trazadone and desipramine on motor recovery in brain-injured rats. *Am J Phys Med Rehabil* 72:286-293
9. Bueno-Nava A, Montes S, De la Garza-Montaña P, Alfaro-Rodríguez A, Ortiz Ascención, González-Piña R. 2008. Reversal of noradrenergic depletion and lipid peroxidation in the pons after brain injury correlates with motor function recovery in rats. *Neurosci Lett* 443
10. Bueno-Nava A, González Piña R, Alfaro-Rodríguez A, Nekrassov-Protasova V, Durand-Rivera A, Montes S, Fructuoso-Ayala F. 2010. Recovery of Motor Deficit, Cerebellar Serotonin and Lipid Peroxidation Levels in the Cortex of Injured Rats. *Neurochem Res* 35.

11. Casares-Cruz K. 2015. La enfermedad vascular cerebral en México: un problema de salud en incremento. *Anales de Radiología México* 14:243-244
12. Chang D, Wachtel J U, Young S R y Kang U J.1999. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience*, VV, 617±628
13. Chen JR, Cheng JY, Sheu CC, Tseng GF, Wang TJ, Huang YS. 2008. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke, *J. Anat*, 213:249-258
14. Chiquete E, Ruíz J, Murillo B, et al. 2011. Mortalidad por enfermedad vascular cerebral en México, 2000-2008: Una exhortación a la acción. *Rev Mex Neuroci.*;12:235-41
15. Connor T J, Kelliher P, Harkin A, Kelly J P y Leonard B E. 1999. Reboxetine attenuates forced swim test-induced behavioural and neurochemical alterations in the rat. *Eur Jou of Phar* 379:125-133
16. Cramer SC. 2015. Drugs to Enhance Motor Recovery After Stroke . *Stroke* 46:2998-3005
17. Crawley J .1999. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* 835:18–26
18. Daadi M M, Maag A L y Steinberg G A. 2008. Adherent Self-Renewable Human Embryonic Stem Cell- Derived Neural Stem Cell Line: Functional Engraftment in Experimental Stroke Model. *Plos one* 3:2
19. Diez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. 2001. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. *Rev Neurol* 33, 455-464
20. Dunn-Meynell A, Pan S, Levin B E. 1994. Focal traumatic brain injury causes widespread reductions in rat brain norepinephrine turnover from 6 to 24 hr. *Brain Res* 660:88-95

21. Feeney D M, Sutton R L. 1988. Catecholamines and recovery of function after brain damage. In: Sabel B A, Stein D G, eds. *Pharmacological Approaches to the Treatment on Brain and Spinal Cord Injury*. New York: Plenum 121-142
22. Flöel A, Breitenstein C, Hummel F, Celnik P, Gingert C, Sawaki L, Knecht S, Cohen LG. 2005. Dopaminergic influences on formation of a motor memory. *Ann Neurol*. 58:121-130.
23. Freivogel S. 1997. Therapeutische Konzepte, in: *Motorische Rehabilitation nach Schädelhirntrauma*, S. Freivogel, Pflaum Verlag, München, pp. 189.
24. Garwicz M (2002) Spinal reflexes provide motor error signals to cerebellar modules-relevance for motor coordination. *Brain Res Brain Res Rev* 40:152–165
25. Sutton R.L. y Feeney D.M. 1992. Alpha-noradrenergic agonists and antagonists affected recovery and maintenance of beamwalking ability after sensorimotor cortex ablation in the rat, *Restor Neurol Neurosci* 4, 1–11.
26. Gladstone D J y Black S E. 2000. Enhancing recovery after stroke with noradrenergic pharmacotherapy: a new frontier? *The Canadian Jou of Neur Sci* 27:97-105
27. González-Piña R, Bueno-Nava A, Escalante-Membrillo C, Montes S, González-Maciel A, Ayala-Guerrero F. 2003. Cerebellar and pontine norepinephrine contents after motor recovery in rats. *Res. Neurol. Neurosci*, 21, 219-220
28. González-Piña R, Bueno-Nava A, Montes S, Alfaro Rodríguez A, González-Maciel A, Reynoso-Robles R y Ayala-Guerrero F. 2006. Pontine and cerebellar norepinephrine content in adult rats recovering from focal cortical injury. *Neurochem Res* 31:1443-1449
29. Hicks Au, Hewlett K, Windle V, Chernenko G, Ploughman M, Jolkkonen J, et al. 2007. Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke. *Neuroscience* 146, 31-40.

30. Irish S L, Davis G W, Barth T M. 1995. A specific behavioral role for norepinephrine in the recovery of locomotor placing following cortical lesions in the rat. *Soc Neurosci Abstr* 21:170
31. Kelly-Hayes M., Beiser, A., Kase, C.S., Scaramucci, A., D'Agostino, R.B., Wolf, P.A., 2003. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 12 (3), 119–126.
32. Kolominsky-Rabas P, Weber M, Gefeller, et al. 2001. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke.*;32:2735-40.
33. Kompoliti K y Verhagen-Metman L. 2010. The encyclopedia of movement disorders. Elsevier, vol 1, pp 125-127.
34. Martín A, Gómez-Vallejo V, San Sebastián E, Padró D, Markuerkiaga I, Llarena I y Llop J. 2013. In vivo imaging of dopaminergic neurotransmission after transient focal ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33: 244–252
35. Meintzschel F, Ziemann U. 2006. Modification of practice-dependent plasticity in human motor cortex by neuromodulators. *Cereb Cortex.* 16:1106--1115
36. Dyan I. y Finberg J.P.M. 2001. L-DOPA increases release of noradrenaline in rat frontal cortex, *Neural Plasticity* 8, 169.
37. Merck Canada Inc. 2014. Product monograph Sinemet. pp.7
38. Metzger C D, Wieggers M, Walter M, Abler B, Graf H. 2015. Local and Global Resting State Activity in the Noradrenergic and Dopaminergic Pathway Modulated by Reboxetine and Amisulpride in Healthy Subjects. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 1-9
39. Michelli F, Nogués MA, Asconapé JJ, Fernández-Pardal MM y Biller J. 2002. Tratado de neurología clínica. Ed. Panamericana, pp.1308-1337.
40. Molina-Luna K, Pekanovik A, Röhrich S, Hertler B, Schubring-Giese M, Rioult-Pedotti M S, Luft A R. 2009. Dopamine in Motor Cortex Is Necessary for Skill Learning and Synaptic Plasticity. *PLoS ONE* 4(9), e7082

40. Prasad M R, Ramaiah C, McIntosh T R, et al. 1994. Regional levels of lactate and norepinephrine after experimental brain injury. *J Neurochem* 63:1086-1094
41. Puentes S, Kurachi M, Shibasaki K, Naruse M, Yoshimoto Y, Mikuni M, Imai H, Ishizaki Y. 2010. Brain microvascular endothelial cell transplantation ameliorates ischemic white matter damage. *Brain Res.* 1469: 43-53
42. Ruscher K, Kuric E, Wieloch T. 2012. Levodopa Treatment Improves Functional Recovery After Experimental Stroke. *Stroke*, 43: 507-513
43. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. 2010. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exper and Trans Stroke Med*, 2:13.
44. Scheidtmann K, Fries W, Müller F y Koenig E.2001. Effect of levodopa in combination with physiotherapy on functional motor recovery after stroke: a prospective, randomised, double-blind study, *Lancet* 358: 787–790.
45. Selassie, A. W., Zaloshnja, E., Langlois, J. A., Miller, T., Jones, P., & Steiner, C. 2008. Incidence of long-term disability following traumatic brain injury hospitalization, United States, *J Head Trauma Rehabil*, Vol.23, No. 2, pp. 123-131
46. Stahl, S M. 2011. Stahl's Essential Pharmacology. The prescribers Guide. 4th ed. Cambridge University Press, pp. 513.
47. Strong K, Mathers C, Bonita R. 2007. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol.*;6:182-87.
48. Sutton R.L. y Feeney D.M. 1992. Alpha-noradrenergic agonists and antagonists affected recovery and maintenance of beamwalking ability after sensorimotor cortex ablation in the rat, *Restor Neurol Neurosci* 4, 1–11.
49. Tamura Y, Ueki Y, Lin P, Vorbach S, Mima T, Kakigi R, Hallett M. 2009. Disordered plasticity in the primary somatosensory cortex in focal hand dystonia. *Brain*. 132:749--755.
50. Urakawa S, Hida H, Masuda T, Misumi S, Kim T S y Nishino H. 2007. environmental enrichment brings a beneficial effect on beam walking and enhances the migration of doublecortin-positive cells following striatal lesions in rats. *Neuroscience* 144: 920-933.

51. Wang L E, Fink G R, Diekhoff S, Rehme A K, Eickhoff S B, Grefkes C. 2011. Noradrenergic Enhancement Improves Motor Network Connectivity in Stroke Patients. *Ann Neurol* 69: 375-388.
52. Wong E H F, Sonders M S, Amara S G. 2000. Reboxetine: a pharmacologically
53. potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor. *Biol Psychiatry*; 47:818–829.
54. Wu X, Moges H, De Taboada L, Anders J. 2012. Comparison of the effects of pulsed and continuous wave light on axonal regeneration in a rat model of spinal cord injury. *Lasers Med Sci*, 27: 525-528
55. Ziemann U, Paulus W, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Byblow WD, Berardelli A, Siebner HR, Classen J, Cohen LG, Rothwell JC. 2008. Consensus: motor cortex plasticity protocols. *Brain Stimul.*1:164--182.
56. Zhao C, Wang J, Zhao S, Nie Y. 2009. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia–reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats. *Tohoku J. Exp. Med*, 218: 301-308
57. Zhu H F, Wan D, Luo Y, Zhou J L, Chen L, Xu XY. 2010. Catalpol Increases Brain Angiogenesis and Up-Regulates VEGF and EPO in the Rat after Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *Int. J. Biol. Sci.* 6: 443-453
58. Zittel S, Weiller C, Liepert J. 2007. Reboxetine improves motor function in chronic stroke. A pilot study. *J Neurol.* 254:197–201.

