
APLICACIÓN DEL TEST DE LA BARRA TRANSVERSAL MODIFICADO PARA EVALUAR RATAS HEMIPARKINSONIZADAS.

Modify Beam Transversal Test to Evaluate Hemiparkinsonian Rats.

Lic. LISETTE BLANCO LEZCANO^{1*}, Ph. D.; Lic. LOURDES DEL C. LORIGADOS PEDRE¹, Ph. D.; Lic. CARIDAD I. FERNÁNDEZ VERDECIA¹, Dr. TERESA SERRANO SÁNCHEZ¹, Dr. NANCY PAVÓN FUENTES¹, Ph. D.; Lic. LILIANA FRANCIS TURNER², Ph. D.
Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN),
Ave. 25, # 15805 e/ 158 y 160, Playa, CP: 11300, Habana, Cuba.
Grupo de Investigación Modelos Experimentales para las Ciencias ZooHumanas. Universidad del Tolima, 546. PBX: 264 42 19. Barrio Santa Elena Ibagué, Tolima, Colombia.

*Autor de Correspondencia: Lisette Blanco Lezcano,
Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN),
Departamento de Neurofisiología Experimental, Laboratorio de Biomodelos. Ave. 25 # 15805 e/ 158 y 160, Playa, CP: 11300, Habana, Cuba. Tel.: +53 7 271 68 41, Fax: +53 7 273 24 20, lisette.blanco@infomed.sld.cu

Presentado 13 de enero de 2010, aceptado 12 de mayo de 2010, correcciones 13 de mayo de 2010.

RESUMEN

La degeneración nigroestriatal que caracteriza a la enfermedad de Parkinson (EP) es estudiada en modelos experimentales en roedores por inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). El presente estudio presenta una versión modificada del test de la barra transversal (TBT) que permite la cuantificación del déficit motor a través de: tiempo que demora la rata en alcanzar una de las plataformas (latencia de escape, LE); tiempo que demora en caer de la barra (latencia de caída, LC); número total de errores cometidos durante la ejecución en cada barra (número de errores, NE). La forma y el diámetro de la sección transversal de la barra se modificaron desde barras rectangulares y circulares de 2,5 cm de diámetro hasta barras con esta misma forma y 1 cm de diámetro respectivamente lo cual impuso la mayor dificultad a la ejecución del test. Tres grupos de ratas Wistar fueron evaluados: no-tratadas (n=15), lesionadas con 6-OHDA (n=14) y falsas operadas (n=14). Todas las variables estudiadas mostraron diferencias significativas entre ratas controles y hemiparkinsonizadas. Para todos los tipos de barras, las variables LE y NE se incrementaron mientras que la LC disminuyó significativamente en las ratas hemiparkinsonizadas en comparación con las ratas controles. La LC mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre las barras de mayor y menor diámetro. TBT es un test que explora la función sensoriomotora, no requiere grandes sesiones de entrenamiento previo ni motivación aversiva ni privación de alimento. Este test resulta de gran utilidad para evaluar las deficiencias motoras que se presentan

en el modelo de hemiparkinsonismo unilateral así como en otros modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas.

Palabras clave: 6-hydroxydopamina, test de la barra transversal, dopamine, enfermedad de Parkinson.

ABSTRACT

The nigrostriatal degeneration underlying Parkinson's disease (PD) is commonly studied in experimental animals by injection of the neurotoxin 6-hydroxydopamine. The present study describes a modified version of a beam traversal test which allows the quantification of the motor deficit through the time spent to arrive to the platform once all four paws of the animals are in contact with the beam (escape latency, EL), the time spent before falling (tumbled down latency, TDL) and the number of errors (NE) committed for the animals in each beam. The shape and the diameter of the cross section of the beams were modified from rectangular and circular cross section with 2,5 cm of diameter to the same shape with 1 cm of diameter, which induced a high difficulty to the execution of the test. Three groups of Wistar rats were examined: untreated (n=15), lesioned with 6-hydroxydopamine (n=14), and sham-operated (n=14). All variables studied showed significant differences between control and hemiparkinsonian rats. The EL and the NE were increased and the TDL was decreased in hemiparkinsonian rats for all beams in comparison with control rats. In TDL the significant differences between groups were more evident ($p < 0.001$) for the beams with high cross section irrespective of the shape of the cross section. BTT is a convenient sensorimotor test that does not need to be trained extensively, and require adverse motivation or food deprivation and appears to be very useful in evaluating the motor deficits in established unilateral model of PD and also other experimental models.

Key words: 6-hydroxydopamine, beam traversal test, dopamine, Parkinson's disease.

INTRODUCCIÓN

En el más común de los modelos experimentales de enfermedad de Parkinson (EP), el modelo en ratas, las fibras dopaminérgicas son destruidas por la inyección unilateral de la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el *striatum*, la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) o su principal eferencia, el haz prosencefálico conocido como vía nigroestriatal (VNE) (Schober, 2004). La lesión puede resultar en una disminución drástica de las concentraciones estriatales de dopamina (DA) causando una asimetría funcional de moderada a severa (Zigmond *et al.*, 2002). Esta disfunción dopaminérgica se asocia con un trastorno de la deambulación en la rata que muestra algunos puntos coincidentes con los trastornos de la marcha que se presentan en la enfermedad de Parkinson idiopática (Doan *et al.*, 2008).

Complejos cambios conductuales resultan como consecuencia de la disminución de los niveles de DA estriatal. El carácter monosináptico y lateralizado de la vía dopaminérgica nigroestriatal la hacen especialmente apropiada para estudiar la repercusión funcional del aumento o disminución unilateral de los niveles de actividad dopaminérgica

(Herrera-Marschitz *et al.*, 1986; Cenci *et al.*, 2002). El predominio de una de las dos vías nigroestriatales se manifiesta en asimetría postural y de movimientos, cuya dirección refleja, contralateralmente, el hemisferio dominante (Woodlee y Schallert, 2004). Esta desviación postural puede ser exagerada y transformada en una conducta compulsiva de tipo rotacional cuando se estimula al animal con fármacos que aumentan la concentración de DA en la hendidura sináptica, tales como la anfetamina (Herrera-Marschitz *et al.*, 1986). La dirección de la rotación producida es homolateral ya que es independiente de las vías dopaminérgicas intactas (Schwartz y Huston, 1996).

La inyección de la neurotoxina 6-OHDA afecta funcionalmente los receptores post sinápticos localizados en el mismo lado de la lesión los cuales desarrollan supersensibilidad y en consecuencia agonistas dopaminérgicos directos como la apomorfina producen rotación contralateral (Fornaguera *et al.*, 1994; Metz y Whishaw, 2002). Los giros han sido explicados como resultado de la asimetría postural, niveles asimétricos de excitación en los circuitos dopaminérgicos centrales y asimetría en la respuesta a estímulos sensoriales (Miklyeva *et al.*, 1995; Metz y Whishaw, 2002).

Aunque los test de anfetamina y apomorfina permiten abordar el desbalance de la actividad dopaminérgica central, otros test libres de fármacos han permitido también estudiar la integridad funcional del sistema dopaminérgico nigroestriatal (Cenci *et al.*, 2002).

El modelo de hemiparkinsonismo en ratas se caracteriza por acinesia en la extremidad anterior contralateral a la lesión demostrado a través del test de los pasos y de la prueba de habilidades motoras de las extremidades anteriores comúnmente conocido como “Prueba de la Escalera” (Whishaw *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1999; Stein, 2009). Adicionalmente las ratas no pueden usar con efectividad sus extremidades contralaterales a la lesión para iniciar el movimiento, alternar el centro de masa del cuerpo durante la locomoción o mantener el control postural (Schallert *et al.*, 2000; Metz *et al.*, 2004; Woodlee *et al.*, 2008). Un acercamiento diferente a los efectos de la depleción dopaminérgica es examinar como se afecta la habilidad de las ratas para mantener el equilibrio y el patrón de locomoción en una superficie estrecha (Allbutt and Henderson, 2007).

En el presente trabajo, describimos una versión modificada del test de la barra transversal (TBT) (Thullier *et al.*, 1996). Esta prueba consiste en situar a la rata en una barra muy estrecha, elevada y medir su habilidad para cruzarla y alcanzar una de las dos plataformas de escape situadas en los extremos de la barra. La principal modificación es que el diámetro y la forma de la barra cambian, comenzando con una barra de 2,5 cm de diámetro y sección transversal rectangular (STR) seguido por una barra con el mismo diámetro y sección transversal circular (STC). A continuación se presentan barras de STR y STC y 1 cm de diámetro. Las ventajas de este test son: los movimientos de las ratas pueden ser monitoreados específica y separadamente, la conducta que se evalúa es espontánea en el sentido que no es manipulada externa ni internamente y no requiere de largas sesiones de entrenamiento previo.

MATERIALES Y MÉTODOS

SUJETOS EXPERIMENTALES

El estudio fue realizado en ratas Wistar machos adultos *Rattus norvegicus* pesando entre 200 a 250 g obtenidos a partir del Centro para la Producción de Animales de Labo-

ratorio (CENPALAB, Habana, Cuba). Se mantuvieron tres ratas por caja durante todo el experimento. Los animales fueron mantenidos con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad así como acceso libre al agua y los alimentos. Durante toda la investigación, se realizaron esfuerzos máximos para minimizar el sufrimiento animal y el trabajo experimental cumplió con las Guías para el cuidado, uso y reproducción de animales de laboratorio (Guías, CENPALAB, Cuba, 2000). Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética del CIREN y cumplieron además con las normas dictadas por el *National Institute of Health Guide for the Care and Use of laboratory Animals (NIH Publications N.º 80-23)*.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

La mesa quirúrgica y el equipo de cirugía estereotáxica fueron desinfectados con soluciones alcohólicas y acuosas de Betadina. Se aplicó un lubricante ocular (Lacrilube) para prevenir la resequeidad corneal. Las ratas fueron anestesiadas por medio de la administración intraperitoneal (i.p) de una solución de hidrato de cloral (420 mg/kg de peso) y seguidamente se colocaron en un equipo de cirugía estereotáxica para roedores (Stoelting, EE.UU.). Cada rata recibió 3 µL de una solución que contenía 8 µg de 6-OHDA (Sigma, St. Louis, EE. UU.) en 3 µL de solución salina fisiológica al 0,9% (SSF) + 0,5 mg/mL de ácido ascórbico, a razón de 1 µL/min. La inyección se realizó en las coordenadas correspondientes a la SNpc derecha de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson: AP = -4,9, ML = 1,7, DV = 8,1 (referentes a Bregma) (Paxinos y Watson, 1998). La aguja de la jeringuilla fue mantenida en el sitio durante tres minutos después de finalizada la inyección para prevenir el reflujo de la solución de 6-OHDA. Se administró SSF con el mismo volumen y en las mismas coordenadas para conformar un grupo control de ratas con falsa lesión. Se conformaron los siguientes grupos experimentales: no-tratadas (n=15), lesionadas con 6-OHDA (n=14) y falsas operadas (n=14).

ACTIVIDAD ROTATORIA

Para comprobar la efectividad de la lesión neurotóxica, un mes después de la inyección de 6-OHDA se estudió la actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (5 mg/kg peso, i.p) de acuerdo al procedimiento descrito previamente (Blanco *et al.*, 2008a). En el estudio solo se incluyeron las ratas que mostraron como mínimo siete giros completos homolaterales a la lesión en 1 min lo que se corresponde con 90% aproximadamente de denervación dopaminérgica (datos no mostrados). Esta variable y el sentido de giro se determinaron en 90 min mediante un Multicontador Electrónico LE 3806 acoplado a sensores LE 902 (PanLab, Barcelona, España).

EVALUACIÓN CONDUCTUAL. APARATO Y PROCEDIMIENTO

La prueba de la barra transversal fue realizada en condiciones apropiadas de silencio e iluminación evaluando sus resultados por observación directa. Las ratas fueron colocadas en el punto medio de una barra de 60 cm de longitud en cuyos extremos se colocaron plataformas de escape redondas de 15 cm de diámetro (Fig. 1A). La barra se situó a una altura de 60 cm del suelo e inmediatamente debajo de la misma fueron colocadas pequeñas mantas de aire con el propósito de proteger a los animales de posibles golpes si caían de la barra. Cada ensayo tuvo una duración de 1 min y durante este tiempo se cuantificaron las siguientes variables: tiempo que demora la rata en alcanzar una de las

dos plataformas de escape (latencia de escape, LE); fallo para alcanzar una de las plataformas hasta caer de la barra (latencia de caída, LC); número de errores cometidos por la rata durante la ejecución de la prueba (número de errores, NE). Un error fue definido como fallo infructuoso para asirse a la barra con cualquiera de sus extremidades o la cola (fallo de sujeción), pérdida del equilibrio (fallo de balance) o caída de la barra antes de concluir el minuto asignado a cada ensayo (caída de la barra). Las barras se presentaron en el siguiente orden: STR 2,5 cm de diámetro, STC 2,5 cm de diámetro, STR 1 cm de diámetro, STC 1 cm de diámetro (Fig. 1B).

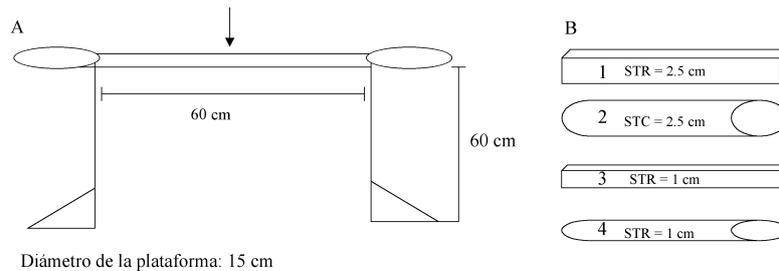


Figura 1. Diagrama representativo del aparato utilizado para el test de la barra transversal. A. Dos plataformas de escape son unidas por medio de la barra. La flecha central indica el punto medio de la barra donde se sitúa a la rata al comienzo de cada ensayo. B. Barras empleadas en la prueba: STR 2,5 cm = barra de sección transversal rectangular de 2,5 cm, STC 2,5 cm = barra de sección transversal circular de 2,5 cm, STR 1 cm = barra de sección transversal rectangular de 1 cm, STC 1 cm = barra de sección transversal circular de 1 cm. La numeración consecutiva 1... 4 indica el orden en el que fueron presentadas las barras.

El experimento completo se realizó durante dos días consecutivos, efectuándose tres ensayos cada día. Las variables fueron computadas como el valor medio de los seis valores obtenidos contemplando todos los ensayos.

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA (TH)

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (480 mg/kg de peso, i.p) y perfundidos a través de la aorta ascendente con 500 mL de NaCl 0,9% y 500 mL de una solución fijadora (paraformaldehído 4% en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4). A continuación se extrajeron los cerebros, se conservaron en la solución fijadora por 1 h, se lavaron en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4, se crioprotegieron en sacarosa al 7, 15 y 30% (24 h en cada concentración) y se congelaron en nitrógeno líquido. Seguidamente se obtuvieron cortes coronales (20 μ m de grosor) de la SNpc aproximadamente desde la coordenada AP: -4,80 hasta la coordenada AP: -6,72 de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1998). La determinación de la extensión de la denervación dopaminérgica nigral se realizó por medio de la inmunohistoquímica para la enzima TH de acuerdo al procedimiento descrito (Blanco *et al.*, 2008b).

Los animales que mostraron una localización anatómicamente incorrecta de la inyección de la neurotoxina 6-OHDA fueron excluidos del análisis.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se realizó la comprobación de la distribución normal de los datos y la homogeneidad

de sus varianzas mediante los test de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett respectivamente. Las LE y LC fueron comparadas entre grupos experimentales mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple seguido por una prueba de Tukey. El número de errores cometidos por las ratas fue comparado entre grupos mediante un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Student-Newman-Keuls (SNK). El nivel de significación para el análisis estadístico fue de 0,05. Los datos se presentan como $X \pm E.E.M.$ Los datos fueron procesados y analizados mediante el software profesional STATISTICA (StatSoft Inc., 2003).

RESULTADOS

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

La inyección de 6-OHDA produjo una pérdida drástica de cuerpos celulares inmunoreactivos a la enzima TH alrededor del sitio de inyección de la neurotoxina (Fig. 2A). La lesión se extendió en sentido anteroposterior aproximadamente desde la coordinada AP: -4,80 hasta AP: -6,30 interesando todas las subdivisiones de la SNpc: dorsal, medial, lateral y ventral (Fig. 2B).

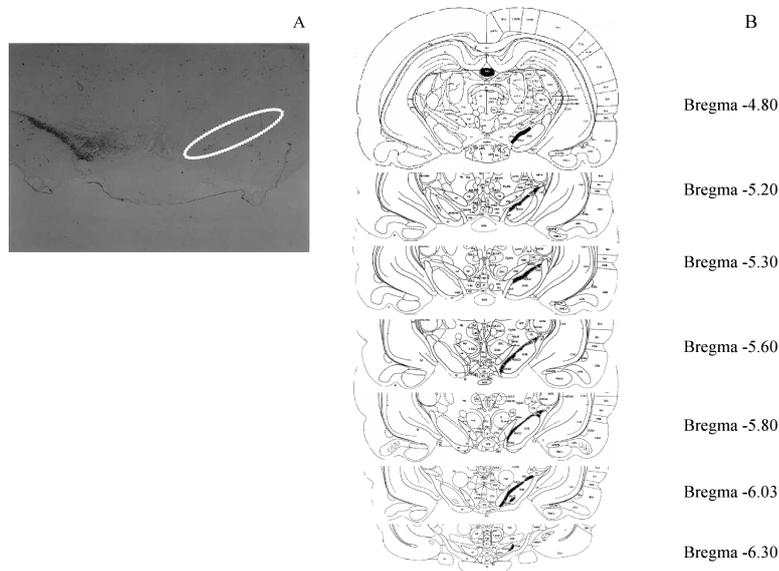


Figura 2. Lesión neurotóxica de la substantia nigra pars compacta (SNpc) por inyección estereotáxica de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A. Microfotografía representativa de la inmunodetección de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en un corte coronal de la SNc de una rata inyectada con 6-OHDA. (10x). El área señalada indica la zona correspondiente a la SNc del hemisferio lesionado (derecho). Nótese la pérdida de cuerpos celulares dopaminérgicos en el hemisferio derecho al comparar con el hemisferio contralateral en el que se aprecia la zona correspondiente a la SNpc con abundante inmunopositividad a la enzima TH. B. Secciones del atlas representativas del tamaño de la lesión por inyección de la neurotoxina 6-OHDA en la SNpc. El área sombreada corresponde a las distintas subdivisiones de la SNpc comprometidas en la degeneración inducida por inyección de 6-OHDA. SNCD: *substantia nigra pars compacta dorsal*, SNM: *substantia nigra pars compacta medial*, SNL: *substantia nigra pars compacta lateral*, SNCV: *substantia nigra pars compacta ventral*.

ESTUDIO DE COORDINACIÓN MOTORA

Todas las ratas ejecutaron el TBT pero mostraron diferentes estrategias de sujeción y soporte en dependencia de su condición experimental y de la forma y diámetro de la barra en cada caso.

Las ratas no tratadas mostraron una estrategia de locomoción óptima empleando sus cuatro extremidades y la cola para garantizar la sujeción y el soporte (Fig. 3A).

Las ratas hemiparkinsonizadas adoptaron una postura asimétrica y frecuentemente cojearon y mantuvieron con cierto retraso la extremidad posterior contralateral a la inyección de 6-OHDA (Fig. 3B). Este tipo de trastorno se enfatizó cuando la barra presentó STC (Fig 3C).

Todas las variables estudiadas mostraron diferencias significativas entre ratas no tratadas, falsas tratadas y lesionadas con 6-OHDA lo que apunta a la eficacia del test para evaluar la disfunción motora en el modelo de 6-OHDA.

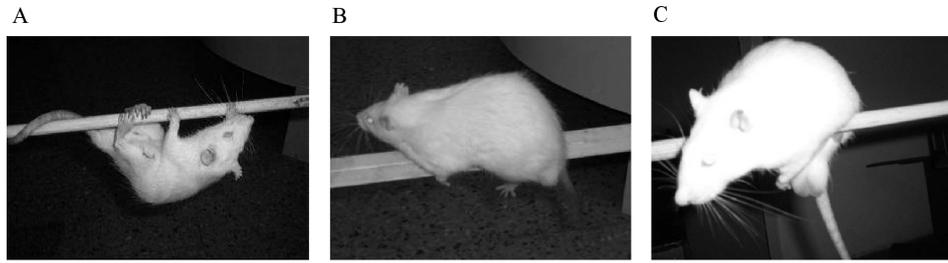


Figura 3. Ejecución en la prueba de la barra transversal. A. Rata no tratada mostrando una estrategia de sujeción que involucra a las cuatro extremidades y la cola y logra un soporte y balance adecuado sobre la barra. B-C. Rata hemiparkinsonizada mostrando una estrategia de soporte que no involucra a las extremidades contralaterales a la lesión tanto para la barra rectangular (B) como para la circular (C).

La LE se incrementó significativamente en el grupo de ratas hemiparkinsonizadas en todas las barras. Las diferencias entre los grupos se profundizaron a medida que fue mayor la complejidad de la tarea motora. En este sentido para la barra con STR 2,5 cm de diámetro la LE mostró diferencias ligeramente significativas entre los grupos ($F(2, 35) = 19,69$ $p < 0,01$), mientras que para el resto de las barras las diferencias entre grupos fueron altamente significativas [STC 2,5 cm: $F(2, 41) = 36,83$ $p < 0,001$; STR 1 cm: $F(2,34) = 9,91$ $p < 0,001$; STC 1 cm: $F(2, 32) = 4,41$ $p < 0,001$] (Fig. 4A).

Las latencias de escape y de caída fueron comparadas por medio de un análisis de varianza de clasificación simple seguido de una prueba de Tukey. El número de errores cometidos por las ratas fue comparado usando un test de Kruskal-Wallis seguido por una prueba de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. STR 2,5 cm = barra de sección transversal rectangular de 2,5 cm, STC 2,5 cm = barra de sección transversal circular de 2,5 cm, STR 1 cm = barra de sección transversal rectangular de 1 cm, STC 1 cm = barra de sección transversal circular de 1 cm. Los datos son presentados como $x \pm E.E.M.$

La LC disminuyó significativamente en las ratas hemiparkinsonizadas para los cuatro tipos de barra que se presentaron. Sin embargo estas diferencias fueron más evidentes ($p < 0,001$) para las barras de mayor diámetro de sección transversal sin tomar en cuenta

la forma de la misma (rectangular o circular) [STR 2,5 cm: $F(2, 40) = 15,06$ $p < 0,001$; STC 2,5 cm: $F(2, 35) = 4,10$ $p < 0,001$; STR 1cm: $F(2, 34) = 4,49$ $p < 0,05$; STC 1cm: $F(2, 39) = 7,95$ $p < 0,05$] (Fig. 4B).

El número de errores cometidos por las ratas se incrementó también en el mismo sentido de la dificultad de la prueba. Las ratas hemiparkinsonizadas exhibieron un incremento significativo en esta variable para todos los tipos de barra en comparación con las ratas control. Las diferencias entre grupos experimentales para las barras de mayor diámetro de sección transversal (2,5 cm) fueron ligeramente significativas independientemente de la forma de dicha sección transversal [STR: $H(2, 34) = 6,92$ $p < 0,05$; STC: $H(2, 45) = 5,48$ $p < 0,01$]. Para el resto de las barras (1 cm de diámetro), las diferencias entre grupos experimentales fueron altamente significativas (STR: $H(2, 43) = 7,31$ $p < 0,001$; STC: $H(2, 45) = 9,16$ $p < 0,001$) (Fig. 4C).

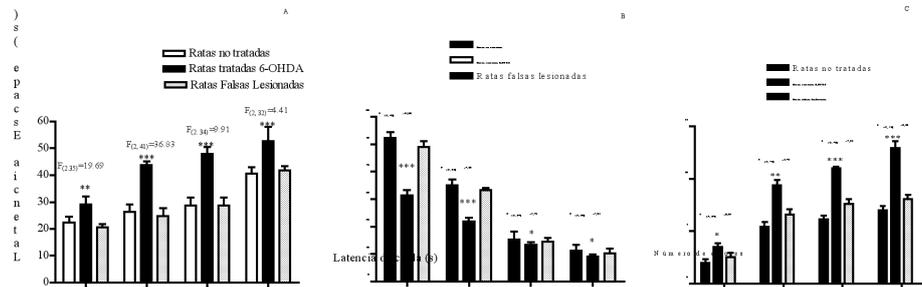


Figura 4. Efecto de la inyección de 6-hidroxdopamina en la coordinación motora evaluado por medio del test de la barra transversal. A. Comparación de la latencia de escape entre grupos para cada barra. B. Comparación de la latencia de caída entre grupos para cada barra. C. Comparación del número de errores cometidos entre grupos para cada barra.

En las barras de mayor diámetro de sección transversal hubo un predominio significativo ($p < 0,05$) de los fallos de sujeción mientras que en las barras de menor diámetro predominaron los fallos de balance y caída de la barra ($p < 0,01$).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo indican que las variables estudiadas permiten la evaluación del compromiso motor de las ratas hemiparkinsonizadas. La LE refleja las posibilidades reales del animal para realizar movimientos compensatorios que le permiten alcanzar una de las dos plataformas. Mientras tanto la LC es un indicador directo del deterioro sensorimotor de la rata hemiparkinsonizada.

El incremento de la LE en las barras de menor diámetro representa una combinación entre la disfunción motora de la rata y la mayor complejidad de la prueba. En concordancia con esta idea las ratas hemiparkinsonizadas demoran más tiempo en arribar correctamente a la plataforma pero esta demora es más acentuada en las barras que presentan diámetro de sección transversal de 1 cm. Otros autores han señalado que la deficiencia dopaminérgica resulta en un incremento de la demora tanto para iniciar el movimiento como para cruzar la barra y alcanzar la plataforma, consistente con la acinesia y bradicinesia observada en modelos animales de EP (Allbutt y Henderson, 2007).

En contraste la disminución de la LC apunta a un mayor compromiso sensorio motor en la ejecución motora de las ratas hemiparkinsonizadas.

Las LE y LC no mostraron diferencias significativas entre los grupos de ratas no tratadas y falsamente tratadas para ninguna de las barras presentadas en el experimento, lo que sugiere que la cirugía no afecta la ejecución motora de las ratas. Por otra parte la cuantificación de los errores cometidos por los animales ofrece una indicación de la calidad de la ejecución motora.

En general el registro de cada variable empeora al mismo tiempo que se incrementa la complejidad de la prueba. Esta observación es particularmente evidente cuando la deficiencia motora es evaluada en la barra STC 1 cm de diámetro ya que esta barra representa la máxima complejidad de la prueba evaluada. En este caso se combinan la pequeña superficie de apoyo con la forma circular, carente de aristas, de la misma. Las aristas facilitan la sujeción y el soporte en una superficie de apoyo angosta (Schallert y Woodle, 2005).

En el presente estudio sugerimos la modificación del test por medio del cambio en la forma y diámetro de la barra graduando de esta forma la complejidad de la prueba. El cambio en el diámetro de la barra ha sido considerado previamente por otros autores, no así el cambio en la forma de la sección transversal (Strome *et al.*, 2006). Strome *et al.*, 2006, refieren una única barra cuyo diámetro se modifica desde 6,5 cm hasta 1,5 cm y los animales son evaluados en cada diámetro en ensayos independientes con sesiones previas de entrenamiento. El presente trabajo sugiere modificar simultáneamente la forma y el diámetro de la barra en el mismo ensayo lo cual pudiera ser muy interesante para evaluar los efectos de un mismo tratamiento en la recuperación gradual de la función motora.

Durante nuestro estudio de actividad motora aplicando el TBT todas las ratas mostraron un patrón de locomoción con secuencias alternantes de acoplamiento diagonal, típico de animales cuadrúpedos (Schallert, 2006). Sin embargo, en concordancia con lo publicado previamente, las ratas hemiparkinsonizadas mostraron incapacidad para usar las extremidades contralaterales a la lesión tanto para realizar ajustes posturales como movimientos de locomoción (Woodle y Schallert, 2004). Esta disfunción es la causa principal de los fallos cometidos por las ratas durante la ejecución de la prueba en las barras de mayor diámetro.

El impedimento en el uso de la extremidad contralateral a la lesión puede asociarse a la dificultad para transferir adecuadamente el peso del cuerpo y con él su centro de masa lo que redundaría en un ajuste postural inadecuado para una pequeña superficie de apoyo (Miklyaeva *et al.*, 1995). Adicionalmente es posible que el lado “no lesionado”, homolateral a la inyección de 6-OHDA, sea insuficiente para compensar la deficiencia motora cuando la lesión es de gran extensión (Warraich *et al.*, 2009).

Se conoce que la deficiencia dopaminérgica estriatal representa un obstáculo para la aplicación efectiva de la fuerza requerida para los movimientos coordinados de todo el cuerpo (Woodle *et al.*, 2008). Este obstáculo puede manifestarse como una deficiencia en el control de las extremidades afectadas, rigidez de las extremidades, disminución de la actividad refleja motora entre otras disfunciones sensoriales y motoras (Miklyaeva *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 1999).

Por otra parte las ratas hemiparkinsonizadas muestran una tendencia espontánea a girar en círculos estrechos que se mantiene en pequeñas superficies de apoyo. Esta conducta acentúa el desbalance del centro de masa adicionando una dificultad más a

la que ya impone el diámetro y la forma de la sección transversal de la barra usada en la evaluación motora (Metz y Whishaw, 2002; Schallert *et al.*, 2000). Esta conducta rotacional deteriora las habilidades motoras de la rata y resulta en fallos más frecuentes cuando el animal realiza movimientos de sujeción o permanece sentado sobre la barra (Metz y Whishaw, 2002).

Durante la ejecución del TBT las ratas depletadas de DA mostraron una pequeña oscilación que balancea el cuerpo del animal interfiriendo con el movimiento de avance sobre la barra (Woodle y Schallert, 2004; Woodle y Schallert, 2006). Estos movimientos oscilatorios y giros espontáneos obligaron a las ratas a adoptar posturas inestables esencialmente cuando el diámetro de la barra disminuye a 1 cm. Este patrón de locomoción coincide con lo señalado previamente por otros autores (Strome *et al.*, 2007).

El TBT es útil para estudiar la coordinación motora en el modelo de hemiparkinsonismo en ratas cuando la toxina es administrada en cualquiera de sus tres principales dianas: la SNpc, el striatum o la VNE. Este test refleja disfunción en múltiples áreas anatómicas tanto del Sistema Nervioso Central como periférico (Strome *et al.*, 2006; Strome *et al.*, 2007; Urakawa *et al.*, 2007).

Después de la inyección de 6-OHDA en la SNpc las neuronas dopaminérgicas comienzan a degenerar en las siguientes 24 horas (Dauer y Przedborsky, 2003). Cuando la toxina se inyecta en el striatum o en la VNE produce una muerte retrógrada más lenta de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, que puede durar aproximadamente tres semanas (Dauer y Przedborsky, 2003; Yuan *et al.*, 2005). Tomando en cuenta el momento exacto en que aparecen los trastornos motores y que las posibilidades de recuperación espontánea son diferentes en las tres alternativas mencionadas anteriormente, es importante considerar el mejor intervalo de tiempo para aplicar el TBT en el modelo de 6-OHDA.

En relación con la calidad de la ejecución motora los fallos de sujeción, balance y caída desde la barra fueron los más frecuentes cometidos por las ratas hemiparkinsonizadas. La caída desde la barra no ha sido señalada en otros artículos en que la 6-OHDA ha sido inyectada en las coordenadas de la VNE (Allbutt y Henderson, 2007). Los autores sugieren que el equilibrio de las ratas no resulta drásticamente comprometido cuando la lesión se practica en el sitio mencionado (Allbutt y Henderson, 2007).

Es bien conocido que la inyección de 6-OHDA en la SNpc (como fue en el presente estudio) es asociada con la degeneración de otras estructuras tales como el núcleo pedunculopontino (NPP) (Blanco *et al.*, 2008a; Blanco *et al.*, 2009). En estas condiciones las neuronas pontinas experimentan un proceso de muerte celular que está en concordancia con lo reportado en humanos (Rinne *et al.*, 2008). Cuando la toxina es inyectada en la VNE estas neuronas son preservadas del proceso degenerativo (Heise *et al.*, 2005). El NPP es un centro de relevo importante en el control de la coordinación motora y el equilibrio y su disfunción puede ser el sustrato morfológico de la conducta que produce la caída de las ratas de la barra transversal observada en el presente estudio (Jenkinson *et al.*, 2009). Será muy interesante estudiar en un futuro la influencia de la disfunción del NPP en la ejecución en la prueba de la barra transversal tomando en cuenta el interés reciente de este núcleo como diana de la terapia de estimulación para pacientes parkinsonianos (Jenkinson *et al.*, 2009).

Los presentes resultados confirman que la prueba de la barra transversal puede ser aplicada para evaluar la disfunción motora en ratas inyectadas en la SNpc tomando en

consideración que es posible cuantificar la discapacidad motora que exhiben los animales por medio de las variables que evalúa la prueba.

La repercusión conductual de la lesión dopaminérgica y de las terapias de reemplazo celular son comúnmente medidas en el laboratorio por medio de conteos de las rotaciones inducidas por drogas dopaminérgicas y los resultados extrapolados a términos de asimetría conductual (Kirik *et al.*, 1998; Dowd y Dunnett, 2005). Sin embargo, la repercusión conductual de la pérdida de la función dopaminérgica y/o su tratamiento quirúrgico es significativamente más compleja. En este sentido la prueba de la barra transversal cambiando simultáneamente la forma y el diámetro de la barra que se utiliza para la evaluación motora permite un análisis detallado de la disfunción motora y el efecto del posible tratamiento posterior.

El TBT es un test sensorimotor muy conveniente que no requiere extensas sesiones de entrenamiento ni privación de alimentos como componente motivacional. La prueba ofrece adicionalmente la posibilidad de evaluar separadamente los errores cometidos por cada hemisferio y los ajustes que realiza cada uno de ellos para lograr una ejecución óptima y alcanzar una de las plataformas.

BIBLIOGRAFÍA

ALLBUTT NH, HENDERSON JM. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods*. 2007;159:195-202.

BLANCO L, LORIGADOS L, MARTÍNEZ L, PAVÓN N, SERRANO T, GONZÁLEZ ME, ROCHA L. Alterations in the density of gabaergic BDZ, mu opioid and muscarinic receptors of the pedunclopontine nucleus in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *J Biological Res-Thessaloniki*. 2008a;9:35-43.

BLANCO L, LORIGADOS L, GARCÍA R, MARTÍNEZ L, PAVÓN N, GONZÁLEZ ME, SERRANO T, BLANCO V. Neuroprotective effect of the systemic delivery of (-) nicotine in hemiparkinsonian rats. *Biotechnología Aplicada*. 2008b;25:126-134.

BLANCO L, LORIGADOS L, OROZCO S, ROCHA L, PAVÓN N, GONZÁLEZ ME, BLANCO V, FRANCIS L. Change in Glu and GABA extracellular concentrations and cell death process in the pedunclopontine nucleus of hemiparkinsonian rats. *J Biological Res-Thessaloniki*. 2009;11:3-11.

CENCI MA, WHISHAW IQ, SCHALLERT T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat?. *Nat Reviews Neuro*. 2002;3(7):574-579.

DAUER W, PRZEDBORSKY S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39:890-909.

DOAN JB, MEVIN KG, WHISHAW IQ, SUCHOWERSKY O. Bilateral impairments of skilled reach-to-eat in early Parkinson's disease patients presenting with unilateral asymmetrical symptoms. *Behav Brain Res*. 2008;194:207-213.

DOWD E, DUNNETT S. Comparison of 6-hydroxydopamine-induced medial forebrain bundle and nigrostriatal terminal lesions in a lateralised nose-poking task in rats. *Behav Brain Res*. 2005;159:153-161.

FORNAGUERA J, CAREY RJ, HUSTON JP, SCHWARTING RKW. Behavioural asymmetries and recovery in rats with different degrees of unilateral dopamine depletion. *Brain Res*. 1994;664:178-88.

GUIDELINES FOR THE CARE, USE AND REPRODUCTION OF LABORATORY ANIMALS. Center for the Production of Laboratory Animals (CENPALAB, Havana, Cuba); Ed. 02-2000:100.

HEISE CE, TEO ZCH, WALLACE BA, ASHKAN K, BENABID AL, MITROFANIS J. Cell survival patterns in the pedunclopontine tegmental nucleus of MPTP monkeys and 6-OHDA-lesioned rats: evidences for differences to idiopathic Parkinson's disease patients?. *Anat Embryol.* 2005;210:282-302.

HERRERA-MARSCHITZ M, UNGERSTEDT U, METTERSTROM T, OLSON L, STROMBERG I. Neurofarmacología de los ganglios basales: consideraciones experimentales y terapéuticas. *Rev Farmacol Clin Exp.* 1986;3:51-53.

JENKINSON N, NANDI D, MUTHUSAMY K, RAY NJ, GREGORY R, STEIN JF, AZIZ TP. Anatomy, physiology, and pathophysiology of the pedunclopontine nucleus. *Mov Disord.* 2009;24(3):319-328.

JOHNSTON RE, SCHALLERT T, BECKER JB. Akinesia and postural abnormality after unilateral dopamine depletion. *Behav Brain Res.* 1999;104:189-196.

KIRIK D, ROSENBLAD C, BJÖRKLUND A. Characterization of behavioural and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol.* 1998;152:259-277.

METZ GA, PIECHARKA DM, KLEIM JA, WHISHAW IQ. Preserved ipsilateral-to-lesion motor map organization in the unilateral 6-OHDA-treated rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2004;1026:126-135.

METZ GA, WHISHAW IQ. Drug-Induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. *Neurosciences.* 2002;111:325-336.

MIKLYAEVA EI, MARTENS DJ, WHISHAW IQ. Impairments and compensatory adjustments in spontaneous movement after unilateral dopamine depletion in rats. *Brain Res.* 1995;681:23-40.

PAXINOS G, WATSON C. 1998 The rat brain stereotaxic coordinates. Academic Press, New York. 1998.

RINNE JO, YONG S, SIK M, COLLAN Y, RÖYTTÄ M. Loss of cholinergic neurons in the pedunclopontine nucleus in Parkinson's disease is related to disability of the patients. *Park and Rel Disord.* 2008;14:553-557.

SCHALLERT T, FLEMING SH M, LEASURE JL, TILLERSON JL, BLAND ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacol.* 2000;39:777-787.

SCHALLERT T, WOODLEE M. Motor system: orienting and placing. En: WHISHAW IQ, KOLB B, editors. *The behaviour of the laboratory rat: a handbook with tests.* New York: Oxford University Press, 2005. p. 129-140.

SCHALLERT T. Behavioral test for preclinical intervention assessment. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherap.* 2006;3:497-504.

SCHOBER A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Cell Tiss Res.* 2004;318:215-224.

SCHWARTING RK, HUSTON JP. The unilateral 6-OHDA lesion model in behavioural brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress Neurobiol.* 1996;50:275-331.

STATSOFT INC: Statistica 6.1 for windows. Statsoft Inc., Tulsa, OK. 2003.

STEIN JF. Akinesia, motor oscillations and the pedunclopontine nucleus in rats and men. *Exp Neurol.* 2009;215:1-4.

STROME EM, CEPEDA IL, SOSSI V, DOUDET DJ. Evaluation of the integrity of the dopamine system in a rodent model of Parkinson's disease: small animal positron emission tomography compared to behavioural assessment and autoradiography. *Mol Imaging Bio.* 2006;8:292-299.

STROME EM, ZIS AP, DOUDET DJ. Electroconvulsive shock enhances striatal dopamine D1 and D3 receptor binding and improves motor performance in 6-OHDA-lesioned rats. *J Psychiatry Neurosci.* 2007;32(3):193-202.

THULLIER F, LALONDE R, MAHLER P, JOYAL C, LESTIENNE F. Dorsal striatal lesions in rats. Effects on exploration and motor coordination. *Archiv Physiol and Biochem.* 1996;104(3):300-306.

URAKAWA S, HIDA H, MASUDA T, MISUMI S, KIM TS, NISHINO H. Environmental enrichment brings a beneficial effect on beam walking and enhances the migration of double cortin-positive cells following striatal lesions in rats. *Neuroscience.* 2007;114:920-933.

WARRAICH ST, ALLBUTT HN, BILLING R, RADFORD J, COSTER MJ, KASSIOU M, HENDERSON JM. Evaluation of behavioural effects of a selective NMDA NR1A/2B receptor antagonist in the unilateral 6-OHDA lesion rat model. *Brain Res Bull.* 2009;78:85-90.

WHISHAW IQ, WOODWARD NC, MIKLYAEVA E, PELLIS S. Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. *Behav Brain Res.* 1997;89:167-177.

WOODLE MT, KANE JR, CHANG J, CORMACK LK, SCHALLERT T. Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinsonian rats: compensatory adaptation for contralateral postural instability?. *Exp Neurol.* 2008;211:511-517.

WOODLE MT, SCHALLERT T. The interplay between behaviour and neurodegeneration in rat models of Parkinson's disease and stroke. *Rest Neurol Neurosc.* 2004;22:153-161.

WOODLE MT, SCHALLERT T. The Impact of Motor Activity and Inactivity on the Brain. *Curr Dir Psychological Sci.* 2006;15(4):203-206.

YUAN H, SARRE S, EBINGER G, MICHOTTE Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods.* 2005;44(1):35-45.

ZIGMOND MJ, HASTINGS TG, PÉREZ RG. Increased dopamine turnover after partial loss of dopaminergic neurons: compensation or toxicity?. *Parkin Rel Disord.* 2002;8:389-393.

