

RAE

1. **TIPO DE DOCUMENTO:** Trabajo de grado para optar por el título de MAGISTER EN NEUROPSICOLOGIA CLINICA
2. **TITULO:** AMBIENTE ENRIQUECIDO, FLEXIBILIDAD COMPORTAMENTAL Y NEUROPROTECCIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE PARKINSON INDUCIDO POR 6-OHDA
3. **AUTORES:** Alexander Gómez-A
4. **LUGAR:** Bogota, D.C.
5. **FECHA:** Julio de 2011
6. **PALABRAS CLAVE:** Parkinson, 6-OHDA, ambiente enriquecido, flexibilidad comportamental, neuroprotección
7. **DESCRIPCION DEL TRABAJO:** El objetivo de este proyecto fue Determinar la influencia de un ambiente enriquecido en la flexibilidad comportamental como neuroprotección en un modelo animal de Parkinson inducido por 6-Hidroxidopamina.
8. **LINEAS DE INVESTIGACION:** El trabajo no se inscribe en ninguna de las líneas de investigación vigentes en la Facultad de psicología
9. **FUENTES CONSULTADAS:** Akerud, P., Canals, J. M., Snyder, E. Y., & Arenas, E. (2001). Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J.Neurosci.*, 21, 8108-8118. Amaya, N., Caballero, M., Gómez, A., Martínez, D., & Quintero, A. (2010). *ENFERMEDAD DE PARKINSON Y ALTERACIONES COGNITIVAS ASOCIADAS: UN ESTUDIO DE CASO*. Universidad de San Buenaventura. Anastasia, A., Torre, L., de Erausquin, G. A., & Masco, D. H. (2009). Enriched environment protects the nigrostriatal dopaminergic system and induces astroglial reaction in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *J.Neurochem.*, 109, 755-765. Arnaiz, S. L., D'Amico, G., Paglia, N., Arismendi, M., Basso, N., & Rosario Lores, A. M. (2004). Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition. *Mol.Aspects Med.*, 25, 91-101. Bellissimo, M. I., Kouzmine, I., Ferro, M. M., de Oliveira, B. H., Canteras, N. S., & Da Cunha, C. (2004). Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? *Neurobiol.Learn.Mem.*, 82, 150-158. Ben, V. & Bruguerolle, B. (2000). Effects of bilateral striatal 6-OHDA lesions on circadian rhythms in the rat: a radiotelemetric study. *Life Sci.*, 67, 1549-1558. Bezard, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. et al. (2003). Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J.Neurosci.*, 23, 10999-11007.
10. **CONTENIDOS:** La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo causado por la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Le caracterizan manifestaciones clínicas motoras, cognitivas y afectivas. Por otro lado, el ambiente enriquecido es un paradigma experimental que se asemeja a situaciones físicas, cognitivas y sociales en los seres humanos. El objetivo del presente estudio fue establecer la influencia de un ambiente enriquecido en la flexibilidad comportamental de un modelo animal de Parkinson inducido por 6-OHDA, y los procesos de neuroprotección generados por dicho ambiente. Los resultados muestran las características típicas del modelo: síntomas motores esperados y destrucción de células dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre la condición (toxina-salina), el ambiente (enriquecido-estándar) y la flexibilidad comportamental.
11. **METODOLOGIA:** El presente estudio es de carácter empírico-analítico, tipo explicativo con un diseño experimental factorial de 2X2 por cuanto busca establecer el efecto que tienen dos condiciones de tratamiento (lesión de la sustancia nigra y cirugía ficticia) y dos tipos de ambientes (estándar y enriquecido) sobre la ejecución de ratas Wistar en una tarea de flexibilidad.
12. **CONCLUSIONES:** El objetivo general fue cumplido aunque la relación entre las variables no haya mostrado diferencias significativas. Con la finalidad de determinar si

la poca muerte neuronal se debió al posible efecto de protección de la anestesia con ketamina/xylacina, se hace necesario replicar la investigación utilizando algún otro anestésico tal como Thiopental. Habría que cambiar el criterio de efectividad en el entrenamiento de 80% de efectividad en una sesión a 80% de efectividad promedio en sesiones ulteriores al aprendizaje. Es completamente necesario completar los grupos para equilibrar el peso relativo de las condiciones y los ambientes

AMBIENTE ENRIQUECIDO, FLEXIBILIDAD COMPORTAMENTAL Y
NEUROPROTECCIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE PARKINSON INDUCIDO
POR 6-OHDA

ALEXANDER GÓMEZ-A

UNIVERSIDAD DE SAN BUENAVENTURA

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

BOGOTÁ, D.C

2011

AMBIENTE ENRIQUECIDO, FLEXIBILIDAD COMPORTAMENTAL Y
NEUROPROTECCIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE PARKINSON INDUCIDO
POR 6-OHDA

ALEXANDER GÓMEZ-A

LUIS FERNANDO CÁRDENAS PARRA

ANDERSSEN VERA MALDONADO

Tabla de Contenido

Resumen 4

Introducción 5

Variables de estudio 12

Problema 13

Objetivos 13

*Hipotesis **¡Error! Marcador no definido.***

Método 15

Tipo de Estudio 15

Animales 15

Aparatos 15

Drogas 16

Procedimiento 16

Cirugía 16

Análisis estadístico 19

Resultados 20

Discusión 25

Conclusiones 29

Referencias 30

Índice de Tablas

Tabla 1 *Comparación de promedios de cantidad de células en SNc 41 días después de la cirugía por condición y ambiente, 22*

Índice de Figuras

Figura 1: Frecuencia de giro a 90° en el test de suspensión por la cola. 20

Figura 2: Microfotografía de SNc mostrando la cantidad de células presente 41 días después de la inyección con solución salina (A) o 6-OHDA (B). 21

Figura 3: Ejecución durante el entrenamiento de los sujetos tratados con salina o con 6-OHDA en los dos tipos de ambiente. 22

Figura 4: Ejecución durante la fase de flexibilidad de los sujetos tratados con salina o con 6-OHDA en los dos tipos de ambiente. 23

Figura 5: Total de aciertos durante las fases de entrenamiento y de flexibilidad para los sujetos tratados con salina o con 6-OHDA en los dos tipos de ambiente. 23

Figura 6: peso promedio de los sujetos en tres momentos distintos del proceso: inicial, medio y final. 24

Resumen

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo causado por la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Le caracterizan manifestaciones clínicas motoras, cognitivas y afectivas. Por otro lado, el ambiente enriquecido es un paradigma experimental que se asemeja a situaciones físicas, cognitivas y sociales en los seres humanos. El objetivo del presente estudio fue establecer la influencia de un ambiente enriquecido en la flexibilidad comportamental de un modelo animal de Parkinson inducido por 6-OHDA, y los procesos de neuroprotección generados por dicho ambiente. Los resultados muestran las características típicas del modelo: síntomas motores esperados y destrucción de células dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre la condición (toxina-salina), el ambiente (enriquecido-estándar) y la flexibilidad comportamental.

Palabras clave: Parkinson, 6-OHDA, ambiente enriquecido, flexibilidad comportamental, neuroprotección

Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder caused by the selective death of nigrostriatal dopaminergic neurons. Parkinson's symptoms include clinical, motor, cognitive and affective alterations. Enriched environment is an experimental paradigm widely used in mimicking human physical, cognitive and social events. In this work we tried to establish the influence of enriched environment on a cognitive flexibility task in an animal model of Parkinson induced by 6-OHDA including neuroprotective effects. No significant differences were found between treatments (6-OHDA vs. control) or environment (standard vs. enriched) on the behavioral flexibility task. These results suggest that 6-OHDA Parkinson's model could not be suitable to induce behavioral flexibility.

Key words: Parkinson, 6-OHDA, enrichment environment, flexibility, neuroprotective effects

Introducción

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico descrito por primera vez en 1817 por el médico Inglés James Parkinson. Desde entonces, el interés por la enfermedad ha suscitado múltiples estudios dirigidos a la identificación de aspectos tales como factores de riesgo, etiología, manifestaciones clínicas y estrategias de abordaje e intervención (Amaya, Caballero, Gómez, Martínez & Quintero, 2010). Dicho interés se relaciona directamente con el impacto que genera sobre los individuos y sus entornos personales, laborales, académicos y sociales. Las estadísticas en el mundo afirman la existencia de 1 persona diagnosticada por cada 100 habitantes mientras que los datos en Colombia, según el estudio neuroepidemiológico realizado en 1996, sitúan la prevalencia en un 4.7 % (IC95%: 2,2 a 8,9) (Pradilla, Vesga, León-Sarmiento & GENECO, 2003). Aunque los datos son antiguos, se muestran muy por encima de la tendencia mundial (1%) algo que, sumado al aumento en la esperanza de vida general, obliga a las instituciones especializadas, universidades e investigadores interesados en el tema a profundizar en más y mejores estrategias de evaluación, diagnóstico e intervención dirigidas a las personas que presentan la patología y sus familias.

Las principales alteraciones de la EP se han relacionado tradicionalmente con el área motora: temblor en reposo, rigidez, lentitud en los movimientos del cuerpo y marcha arrastrando los pies (Da Cunha, Wietzikoski, Bortolanza, Dombrowski, Dos Santos, Boschen, Miyoshi, Vital, Boerngen-Lacerda & Andreatini, 2009), no obstante, la evidencia actual sugiere múltiples dificultades en áreas distintas a la motora. Los pacientes pueden presentar un déficit cognitivo aislado o múltiple mostrando un abanico de alteraciones que van desde la normalidad hasta un avanzado grado de demencia (Rodríguez-Constela, Cabo-López, Bellas-Lamas & Cebrián, 2010).

Sin embargo, aun cuando existe un aumento significativo en la investigación relacionada con EP, hay poca claridad sobre las alteraciones en el estado mental de los sujetos que han sido diagnosticados. El campo de las neurociencias ha permitido profundizar elementos determinantes del desarrollo del Parkinson así como factores facilitadores y obstrutores de su aparición. Dentro de los elementos implicados en su instauración, se identifican alteraciones en estructuras tales como el cuerpo estriado, el globo pálido (GP), el accumbens, el putamen, el tubérculo olfatorio y la amígdala y las conexiones de estos con el núcleo subtalámico y la sustancia nigra (SN). Cada una de estas estructuras cumple con una función específica. Los ganglios basales, por ejemplo, están implicados en el procesamiento de la información para la planificación e inicio del movimiento, así como con los ajustes posturales y mecanismos de inhibición lateral relacionados con el control del temblor (Kandel, Schwartz & Jessell, 2000).

Las alteraciones estructurales y funcionales del sistema nervioso generan cambios en las funciones psicológicas de los sujetos que presentan la enfermedad. De hecho, se ha encontrado evidencia de déficit cognitivo no solo en EP sino en otros trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Huntington (Montoya, Price, Meneer & Lepage, 2006; Grahn, Parkinson & Owen, 2009). Manifestaciones tales como el síndrome disejecutivo y deterioro en la memoria de trabajo son típicas de las etapas iniciales de la enfermedad (Da Cunha, Angelucci, Canteras, Wonnacott & Takahashi, 2002; Bellissimo, Kouzmine, Ferro, de Oliveira, Canteras & Da Cunha, 2004) esto acompañado de déficit en la representación encubierta de los estímulos visoespaciales y en memoria declarativa (Bradley et al., 1989, Owen et al., 1989, 1993; Pillon, 1997; Tamaru, 1997; Goldman et al., 1998; Bosboom et al., 2004; citado en (Da Cunha et al., 2002). No obstante, la principal dificultad parece estar relacionada con las funciones ejecutivas, es decir, con la habilidad cognitiva requerida para dirigir el comportamiento hacia metas y objetivos, adaptarse a las situaciones cambiantes del contexto y, si este lo amerita, establecer las estrategias más adecuadas para resolver los problemas que se presentan. A estas dificultades,

subyace la depleción dopaminérgica nigroestriatal característica de la EP y como consecuencia de ello, el funcionamiento inadecuado del circuito frontoestriatal (Lewis, Dove, Robbins, Barker & Owen, 2003). El déficit en dicho circuito se relaciona además, con procesos superiores como la atención, la memoria, el aprendizaje, la inhibición de comportamientos y la flexibilidad. Todas estas funciones están vinculadas directa o indirectamente con la corteza prefrontal, de tal manera que lesiones en esta área derivan en dificultades de estos procesos. Otras manifestaciones comunes incluyen déficit en las habilidades visoespaciales y visoconstruccionales, así como alteraciones del lenguaje, el habla y la comprensión de frases (Bosboom, Stoffers & Wolters, 2004; Tadaiesky, Dombrowski, Figueiredo, Cargnin-Ferreira, Da Cunha & Takahashi, 2008; Da Cunha et al., 2009).

De especial interés para el presente trabajo es la dificultad que se presenta en la categorización y la flexibilidad cognitiva. Esta última es definida como la habilidad que tienen los sujetos para modificar su comportamiento de acuerdo a los cambios en su ambiente inmediato (Darvas & Palmiter, 2011). Las dificultades en flexibilidad características de la EP son observadas en la ejecución de los sujetos en baterías o pruebas específicas como el test de Wisconsin, donde se evidencian errores patológicos como la perseveración (Sánchez, 2002). Lo interesante del caso (y de ahí la importancia de este proceso para el presente trabajo) es que no se hallaron investigaciones en modelos animales (la definición de este concepto se retoma posteriormente) que aborden el tema de la flexibilidad comportamental en relación con la EP. De hecho, un estudio de 2011 publicado por Darvas & Palmetier examinó flexibilidad cognitiva en ratones que adquirían una estrategia para escapar en un laberinto en Y a partir de la posibilidad para revertir dicha estrategia o buscar una nueva. Sin embargo, el estudio no se realizó en el marco de un modelo animal de Parkinson. Los resultados mostraron diferencias en el cambio de estrategia de acuerdo al sitio de la lesión (estriado dorsal o ventral) donde el estriado dorsal y el ventral eran necesarios para revertir el aprendizaje mientras

que solo el dorsal lo era para establecer nuevas estrategias (Darvas et al., 2011).

Por otro lado, los modelos animales se constituyen en una alternativa para el estudio experimental de patologías presentes en humanos, aunque no reproducen completamente la patología. No obstante, permiten el estudio de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, la efectividad de algunos fármacos y la comprensión global de un trastorno (Luquin, 2000). Para inducir Parkinson en un modelo animal, se han utilizado básicamente dos toxinas: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridina (MPTP) y 6-hydroxydopamina (6-OHDA). En un estudio publicado en 2005 y realizado en la Universidad Federal de Paraná, se hicieron comparaciones entre las características de sujetos cuya lesión fue inducida por 6-OHDA y MPTP. Los resultados muestran que la infusión de MPTP en la Sustancia Nigra , pars compacta (SNc) causa pérdida parcial de neuronas dopaminérgicas y depleción de la dopamina (DA) estriatal características de la EP en etapas iniciales, mientras que la infusión de 6-OHDA causó una mayor pérdida de células dopaminérgicas similar a la neurodegeneración de las etapas avanzadas en EP (Ferro, Bellissimo, Anselmo-Franci, Angellucci, Canteras & Da Cunha, 2005).

Por otro lado, la 6-OHDA causa grandes pérdidas de células dopaminérgicas en la SNc de las ratas. Los efectos destructivos sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN fueron descritos por primera vez en 1968 por Ungersted (Luquin, 2000). Sus efectos han sido estudiados como modelos de la fase avanzada de la EP pues induce lesión dopaminérgica nigral principalmente por la generación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de su oxidación. Esto puede ocurrir espontáneamente o ser inducida por la monoaminoxidasa (MAO) (Ferro, Angelucci, Anselmo-Franci, Canteras & Da Cunha, 2007).

Las lesiones se pueden hacer de forma unilateral o bilateral dependiendo de los intereses de la investigación. De hecho, el modelo unilateral de la EP es uno de los más populares, en particular para investigar sobre terapias y estrategias neuroprotectoras. La ventaja en la utilización de lesiones unilaterales es que cada animal puede ser su propio control (Manciocco, Chiarotti, Vitale, Calamandrei, Laviola & Alleva, 2009).

La administración intracerebral de la 6-OHDA produce una destrucción selectiva de neuronas catecolaminérgicas debido a su alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas (Jonsson & Sachs, 1970). La muerte neuronal producida por 6-OHDA está ligada por un lado, a la acción inhibidora de la cadena respiratoria mitocondrial (Glinka & Youdim, 1995) y por otro, fundamentalmente a la formación de H₂O₂, radicales libres tipo hidroxilo (OH) y quinonas que se producen en su metabolización (Jonsson, 1976). La administración de 6-OHDA en la SNc o en el haz nigroestriado induce una degeneración estática, rápida y casi completa de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Esta degeneración difiere sustancialmente de la que ocurre en la EP en la que hipotéticamente, la pérdida neuronal es lenta y progresiva. Por esta razón, en algunos estudios actuales la toxina es colocada a través de inyección estriatal única (20 ug) o en infusión continua, lo que produce hipotéticamente muerte neuronal lenta y progresiva (Luquin, 2000).

Se han realizado múltiples estudios con modelos animales inducidos por 6-OHDA dirigidos a diferentes procesos o mecanismos. Entre ellos se podrían mencionar ritmos circadianos y 6-OHDA (Ben & Bruguerolle, 2000), efectos de L-DOPA sobre ritmos circadianos en modelos inducidos por 6-OHDA (Boulamery, Simon, Vidal & Bruguerolle, 2010), memoria (De Leonibus, Manago, Giordani, Petrosino, Lopez, Oliverio, Amalric & Mele, 2009; De Leonibus, Pascucci, Lopez, Oliverio, Amalric & Mele, 2007), aprendizaje (Haik, Shear, Hargrove, Patton, Mazei-Robison, Sandstrom & Dunbar, 2008), neuroprotección (Bove, Serrats, Mengod, Cortes, Tolosa & Marin, 2005;

Akerud, Canals, Snyder & Arenas, 2001; Huang, Han, Li, Ren, Ke, Jiang & Pei, 2009; Oiwa, Yoshimura, Nakai & Itakura, 2002; Polazzi, Altamira, Eleuteri, Barbaro, Casadio, Contestabile & Monti, 2009; Sharma, McMillan, Tenn & Niles, 2006).

Es particularmente relevante para los intereses de esta investigación el tema de neuroprotección y los mecanismos utilizados para lograr que se dé. Una de las estrategias más utilizadas es el ambiente enriquecido (AE), un paradigma experimental, a través del cual se establece, presumiblemente, un paralelo físico, social e intelectual con las actividades del ser humano (Li & Tang, 2005; Mora, Segovia & Del Arco, 2007). Esto implica que los sujetos están expuestos a una serie de estímulos para realizar ejercicios físicos (túneles, plataformas, pelotas y figuras geométricas, entre otros) y a estímulos visuales que permitan diferenciar entre los objetos del ambiente. Diversas investigaciones han mostrado múltiples beneficios, como la mejora de las funciones cerebrales a nivel posnatal, observada en neurogenesis y proliferación celular, así como en respuestas neuroprotectoras e inducción de cambios sinápticos que mejoran procesos de aprendizaje y memoria (Mora et al., 2007); cambios significativos a nivel celular, molecular y de comportamiento, particularmente en hipocampo (Rampon, Jiang, Dong, Tang, Lockhart, Schultz, Tsien & Hu, 2000; Rampon, Tang, Goodhouse, Shimizu, Kyin & Tsien, 2000).

Algunos estudios reportan mejoras significativas en el aprendizaje y la memoria relacionadas con neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, incremento del peso y la talla del cerebro y una mayor cantidad de conexiones dendríticas y nuevas sinapsis en diferentes áreas del encéfalo como el cortex y los ganglios basales (Li & Tang, 2005). Así mismo, exposiciones previas a AE generan cambios en la sensibilidad de un sujeto frente a la presencia de un agente neurotóxico, mejorando el afrontamiento que éste hace ante su efecto. Estos resultados han proporcionado nuevas perspectivas sobre los

mecanismos que subyacen a los procesos de plasticidad y su relación con la neurogénesis y el aumento de la densidad sináptica, aspecto de gran importancia en la comprensión de las enfermedades neurodegenerativas y el estudio del envejecimiento (Faherty, Raviie, Herasimtschuk & Smeyne, 2005; Mora et al., 2007)

En relación con EP, la actividad física se asocia a la reducción de riesgo de su presentación. De hecho, hay un estudio con ratones donde se mostró que el ejercicio físico mejora los resultados neuroquímicos y comportamentales en modelos de Parkinson inducidos con 6 OHDA (unilateral) y MPTP (bilateral), así como la resistencia a la neurotoxicidad generada por la toxina (Bezard, Dovero, Belin, Duconger, Jackson-Lewis, Przedborski, Piazza, Gross & Jaber, 2003). De igual manera, se ha encontrado que AE beneficia las funciones motoras en sujetos sin EP y mejora estas funciones en sujetos que han sido tratados con 6-OHDA obteniendo cambios significativos en la ejecución del movimiento. Estos estudios sugieren que la estimulación derivada de los AE representa un importante componente en el diseño de enfoques de rehabilitación para tratamientos neuroprotectivos en enfermedades tales como EP (Jadavji, Kolb & Metz, 2006). En la actualidad, existen múltiples investigaciones dirigidas a identificar los efectos del AE sobre enfermedades neurodegenerativas (Li et al., 2005), la memoria (Rampon et al., 2000) y el aprendizaje (Cao, Huang & Ruan, 2008; Arnaiz, D'Amico, Paglia, Arismendi, Basso & Rosario Lores, 2004).

En 2009 se publicó una investigación en la cual se buscaba establecer el papel neuroprotector del AE en un modelo animal de Parkinson inducido por 6-OHDA. Para ello fueron incluidos en el estudio 21 sujetos experimentales (rata Wistar) asignados a dos grupos: AE y ambiente estándar. Cada grupo permaneció 21 días en el ambiente asignado tiempo después del cual recibieron la toxina o vehículo. Para probar la efectividad de la lesión, se utilizó el test de rotación previa administración de D-anfetamina, marcación retrograda con fluorogold en la vía nigroestriatal, marcación retrograda con para estudiar el

número de neuronas nigrales, inmunohistoquímica y tinción de Nissl con violeta de cresilo. Los resultados obtenidos mostraron inicialmente, que el AE promueve la supervivencia de neuronas dopaminérgicas en la SNc, preserva la vía nigroestriatal después de la lesión con 6-OHDA, reduce la conducta rotatoria en los sujetos lesionados, previene la degeneración temprana inducida por la toxina e induce reacción astrocítica en la SNc anterior después de la lesión (Anastasia, Torre, de Erausquin & Masco, 2009). Todos estos resultados permiten concluir sobre la existencia de múltiples beneficios derivados de los AE y se constituyen en base fundamental del estudio de las enfermedades neurodegenerativas y la búsqueda de soluciones que optimicen la calidad de vida de las personas que las presentan y sus familias.

Variables de estudio

Ambiente (VI)

Ambiente Enriquecido

Se define como un paradigma experimental a través del cual se establecen condiciones físicas, sociales e intelectuales que se asemejan con las actividades del ser humano (Mora et al., 2007). Las dimensiones del ambiente fueron 95cm x 60cm x 70cm. En su interior contenía túneles, juguetes de diferente color y forma, pelotas y plataformas. El número de objetos aumentó cada semana y su distribución dentro de la caja fue modificada cada tercer día, buscando favorecer la exploración del ambiente. El tiempo de permanencia de cada sujeto fue de 21 días

Ambiente Estándar

El ambiente estándar para la investigación consistió en cajas plásticas con medidas de 40cm x 25cm x 25cm en donde se asignaron tres sujetos por grupo. El tiempo de permanencia para cada sujeto fue de 21 días.

Condición (VI)

Toxina (6-OHDA)

6-hidroxidopamina, utilizada para inducir lesión excitotóxica de la sustancia nigra

Salina (sham)

Solución salina colocada en el mismo sitio que la 6-OHDA. Es inocua.

Entrenamiento en tarea de Discriminación (VD)

Definida como la búsqueda que realizaba el sujeto de refuerzo en el comedero cuya luz se encontraba encendida. El porcentaje de aciertos definido para pasar a la test de flexibilidad fue de 80%.

Flexibilidad Comportamental (VD)

Definida como la habilidad que tienen los sujetos para modificar su comportamiento de acuerdo a los cambios en su ambiente inmediato (Darvas et al., 2011). Fue medida a través del porcentaje de aciertos presentados por los sujetos en cada una de las sesiones de flexibilidad, realizando el mismo número de sesiones que las llevadas a cabo durante el entrenamiento. El número de errores no fue tenido en cuenta.

Neuroprotección (VD)

Definida como la tolerancia neuronal, la protección del tejido cerebral, y la prevención de la muerte neuronal mediante la implementación de medidas dirigidas a tal fin. Para el presente estudio se realizó inmunohistoquímica para NeuN con el fin de determinar el número de células dopaminérgicas luego de la administración de 6-OHDA.

Problema

Influencia de un ambiente enriquecido en la flexibilidad comportamental y los procesos neuroprotectivos en un modelo animal de Parkinson inducido por 6-Hidroxidopamina

Objetivos

Objetivo general

Determinar la influencia de un ambiente enriquecido en la flexibilidad comportamental como neuroprotección en un modelo animal de Parkinson inducido por 6-Hidroxidopamina.

Objetivos específicos

1. Determinar la influencia de un ambiente enriquecido en la flexibilidad comportamental de sujetos con 6-ohda
2. Explicar la influencia de un ambiente enriquecido en la flexibilidad comportamental de sujetos con salina
3. Establecer la influencia de un ambiente enriquecido en los procesos neuroprotectores de sujetos con 6-ohda
4. Explicar la influencia de un ambiente enriquecido los procesos neuroprotectores de sujetos con salina

Hipótesis

1. H1 Si los sujetos 6-OHDA permanecen en ambiente enriquecido entonces tendrán mejor ejecución en las tareas de flexibilidad comportamental que aquellos con la misma condición que permanecieron en ambiente estándar
Ho No existen diferencias entre los sujetos que permanecieron en ambiente enriquecido y los que permanecieron en ambiente estándar
2. H1 Si los sujetos 6-OHDA permanecen en ambiente enriquecido entonces se evidenciaran mayores efectos neuroprotectores que aquellos con la misma condición que permanecieron en ambiente estándar
Ho No existen diferencias entre los sujetos que permanecieron en ambiente enriquecido y los que permanecieron en ambiente estándar

Método

Tipo de Estudio

El presente estudio es de tipo explicativo con un diseño experimental factorial de 2X2 por cuanto busca establecer el efecto que tienen dos condiciones de tratamiento (lesión de la sustancia nigra y cirugía ficticia) y dos tipos de ambientes (estándar y enriquecido) sobre la ejecución de ratas Wistar en una tarea de flexibilidad.

Animales

Se utilizaron 32 ratas Wistar macho con pesos entre 240 y 360gm y sin ningún tipo de experiencia a nivel experimental. Los animales fueron almacenados en grupos de tres, en cajas plásticas de 40cm x 25cm x 25cm, bajo condiciones de temperatura (promedio 22°C) y luz controladas (ciclos de 12 horas luz-oscuridad, con las luces encendidas a las 7:00AM). La alimentación para cada sujeto fue de 20 gm de comida (RODENTINA) por día con libre acceso a agua. Los experimentos de comportamiento se llevaron a cabo entre las 16 y las 20 horas del día. El peso de los animales fue controlado al menos una vez por semana durante todo el tiempo de duración del experimento.

Aparatos

Caja de ambiente enriquecido: Se utilizó una jaula de ambiente enriquecido, similar a la descrita por (Anastasia et al., 2009). La caja consistía en un espacio rectangular de 90cm x 79cm con paredes de 25cm. Dentro de la jaula de ambiente enriquecido se colocaron objetos como túneles, juguetes de diversas formas, tamaños, colores y plataformas

Caja de entrenamiento en tarea de flexibilidad: La caja consistía en un espacio de 35cm x 30cm x 40cm, con dos aberturas en la pared frontal)

Drogas

Para la investigación se utilizó 6-OHDA (3ug/2ul por lado, a una velocidad de 2ul/min), preparada en solución salina (0,9%) con adición de 0.1% de ácido ascórbico. Para la cirugía ficticia se utilizó solución salina (0,9%) con ácido ascórbico (0,1%) a la misma velocidad.

Procedimiento

Una vez los sujetos fueron asignados al experimento, se inició un protocolo de alimentación libre con el fin que alcanzaran los pesos adecuados (mínimo 240gm). Durante este proceso, los sujetos se adaptaron a las condiciones de confinamiento y al experimentador. Se realizó la distribución por condición salina-estandar (N=6), salina-ambiente enriquecido (N=6), toxina-estandar (N=10), toxina-ambiente enriquecido (N=10). La asignación de sujetos para los grupos de toxina fue mayor por los altos niveles de mortalidad esperada en este tipo de modelo, secundarios a la pérdida de peso posterior a la cirugía (Ferro et al., 2005).

Cirugía

Para la cirugía, los sujetos fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (70mg/Kg) y Xylacina (10mg/Kg) y sometidos a lesión excitotóxica de la sustancia nigra (AP=3,7mm; ML=2,3mm; DV=7,6mm, usando interaural como referencia, de acuerdo con los atlas de Paxinos & Watson (1986) mediante la microinyección de 6-OHDA (3ug/2ul por lado, a una velocidad de 2ul/min), preparada en solución salina (0,9%) y con adición de 0.1% de ácido ascórbico. Los sujetos sometidos a lesión ficticia (sham) pasaron por el mismo procedimiento, pero recibieron microinyección de solución salina (0,9%) con ácido ascórbico (0,1%) a la misma velocidad.

Después de la cirugía, los animales fueron llevados a recuperación en cajas individuales con temperaturas por encima del medio ambiente, donde permanecían durante 24 horas. Posteriormente, se colocaban en las cajas

donde fueron asignadas inicialmente. El tiempo total de recuperación fue de cinco días y durante estos, los animales tuvieron acceso libre a comida y agua.

Una vez cumplidos los días de recuperación, los animales fueron trasladados al ambiente enriquecido o permanecían en ambiente estándar (dependiendo de la distribución de los grupos). El número de objetos en la jaula de ambiente enriquecido aumentó cada semana (objetos adicionales) cuya distribución fue modificada cada tercer día, buscando favorecer la exploración del ambiente. Al igual que en la recuperación, durante el tiempo de permanencia en el ambiente asignado cada sujeto tenía acceso libre a comida y agua.

El tiempo de permanencia en el ambiente fue de 21 días, contados a partir del sexto día después de la cirugía. La limpieza de los ambientes se realizaba cada tercer día. Los sujetos asignados a ambiente estándar permanecieron en grupos de tres.

Transcurridos los días de asignación a cada ambiente, se inició el proceso de entrenamiento. En esta fase los sujetos fueron entrenados en una tarea de discriminación frente a un estímulo lumínico. Dicha tarea se llevó a cabo en una caja de madera (MDF) con dimensiones de 30cm X 40cm X 30cm y que contaba con dos comederos, cada uno con un estímulo lumínico en la parte superior. El entrenamiento consistió en buscar comida en el comedero cuya luz se encontraba encendida. Se llevaron a cabo sesiones diarias, cada una con 10 ensayos. El experimentador registraba los aciertos/errores en una planilla diseñada para tal fin (ver anexo 1). La fase de entrenamiento finalizaba cuando el sujeto alcanzaba el 80% de efectividad en la tarea (8 aciertos) independientemente del número de la sesión en la cual lo lograba. Una vez la rata alcanzaba 80% de éxitos en la tarea de entrenamiento, se daba inicio a la tarea de flexibilidad. Esta consistió en la búsqueda de comida en el comedero contrario a aquél donde se encontraba encendida la luz. El número de sesiones

fue igual al utilizado en la tarea de entrenamiento para cada uno de los sujetos. Se determinó como acierto, la búsqueda que el sujeto hacía de la comida en el comedero contrario al indicado por el estímulo lumínico en el primer intento. Si el sujeto primero hacía la búsqueda en el comedero cuya luz estaba encendida y posteriormente en el contrario, esto no era contado como ensayo exitoso.

La efectividad de la cirugía fue evaluada a partir del test de suspensión. Este test permite evidenciar, a partir de los esfuerzos que realiza el sujeto por girar sobre su propio eje, la efectividad de la lesión que ha sido inducida. El sujeto es tomado y levantado por su cola durante un periodo de tiempo de 40 segundos, estableciéndose la frecuencia en la cual logra un ángulo de giro de 90° en relación con su propio eje. Fueron tomados al azar 8 sujetos (4 por cada condición toxina-salina) y les fue aplicado el test. Las observaciones fueron realizadas de manera posterior a la cirugía (25 días en promedio) y cada una de ellas fue grabada en video para su posterior análisis. Terminada la fase experimental de flexibilidad, los sujetos fueron perfundidos transcardiacamente. Para esto, los sujetos fueron anestesiados con una combinación de ketamina 70mg/kg y xylacina 10mg/Kg. El contenido sanguíneo fue reemplazado por 200ml de solución salina (0,9%) seguidos por 300ml de paraformaldehido (PFA, 4%). Terminada la perfusión, los cerebros fueron extraídos y mantenidos en PBS por 2 horas y posteriormente en sacarosa al 20% durante 24 horas en promedio. Luego, fueron llevados nuevamente a PBS 0,1% hasta el momento de realizar los cortes.

Los cortes fueron realizados en un Vibratomo (Vibratome 1500) con un espesor de 25um a la altura del mesencéfalo (substancia nigra pars compacta) con el fin de determinar la cantidad de células dopaminérgicas presentes. Se realizó la marcación inmunohistoquímica de células positivas para NeuN y coloración de Nissl con violeta de cresilio, con procedimientos estándar. La marcación de NeuN fue realizada en el Instituto Nacional de Salud. Los cortes fueron montados sobre láminas portaobjeto previamente gelatinizadas,

deshidratados, cubiertos con laminulas para su análisis bajo microscopía óptica. De cada corte fueron tomadas fotografías para realizar el conteo de células presentes. En cada fotografía se hizo primero una marcación sobre las células para posteriormente, realizar el conteo. El número obtenido se promedió de acuerdo a la cantidad de cortes analizados para cada sujeto, de forma que se obtuvo un estimado del número total de células presentes.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el test de suspensión se analizaron utilizando una prueba t. Las tareas de entrenamiento y flexibilidad fueron analizadas utilizando análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. El alfa fue establecido en 0,05.

Resultados

Test de suspensión: La Figura 1 muestra el desempeño de los animales en el test de suspensión. Los resultados obtenidos en el test de suspensión mostraron diferencias significativas entre los sujetos tratados con toxina y con salina ($t[8]=2,425$; $P=0,042$).

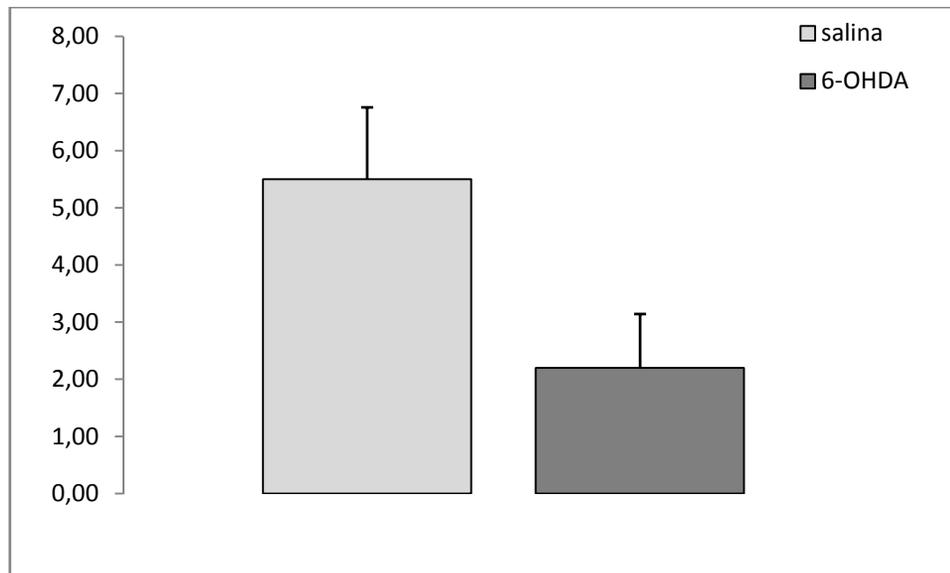


Figura 1: Frecuencia de giro a 90° en el test de suspensión por la cola.

Conteo de células: En relación con el conteo de células, los resultados permitieron evidenciar diferencias entre los grupos que recibieron toxina y los que recibieron salina (medias = 43.325 y 140.75, respectivamente). Sin embargo, no se observan diferencias entre los ambientes enriquecido y estándar (medias =92.25 y 91.87, respectivamente, ver Tabla 1 y Figura 2-A y B). Estos resultados permitieron evidenciar la pérdida de células en sustancia nigra pars compacta como resultado de la toxina.

Tabla 1

Comparación de promedios de cantidad de células en SNc tras 41 días después de la cirugía por condición y ambiente.

	Condición		Ambiente	
	6-OHDA	Salina	Enriquecido	Estándar
Media	43,33	140,75	92,25	91,87

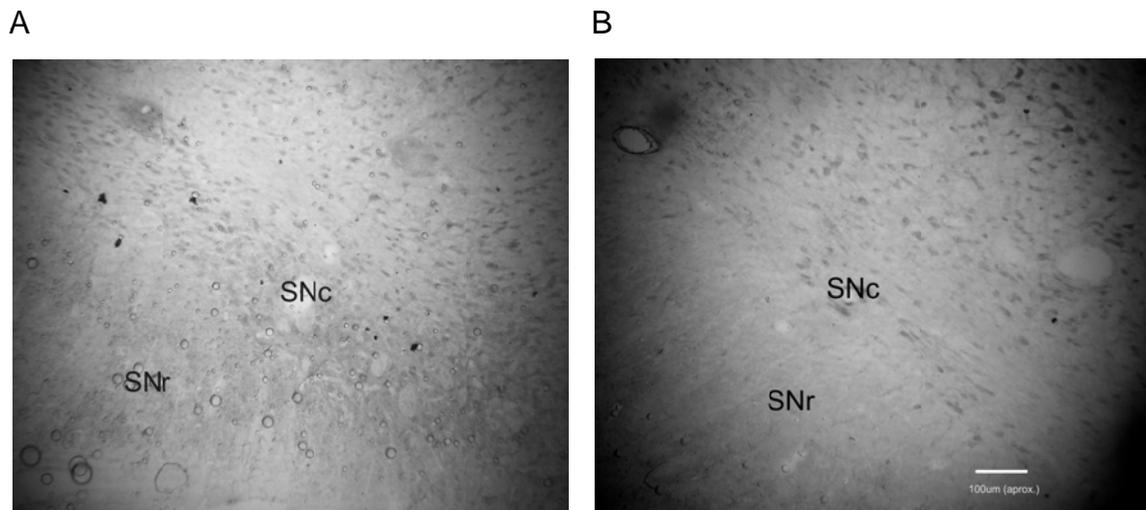


Figura 2: Microfotografía de SNc marcada con NeuN mostrando la cantidad de células presente 41 días después de la inyección con solución salina (A) o 6-OHDA (B).

Entrenamiento: La Figura 3 muestra la ejecución de los sujetos durante el entrenamiento. No se encontraron diferencias significativas durante el entrenamiento ni para la condición de cirugía (toxina o ficticia; $F[1,21]=0,649$; $P=0,373$), ni para el ambiente ($F[1,21]=4,140$; $P=0,055$). Tampoco fueron encontradas diferencias significativas para la interacción de los factores ($F[1,21]=0,342$; $P=0,465$).

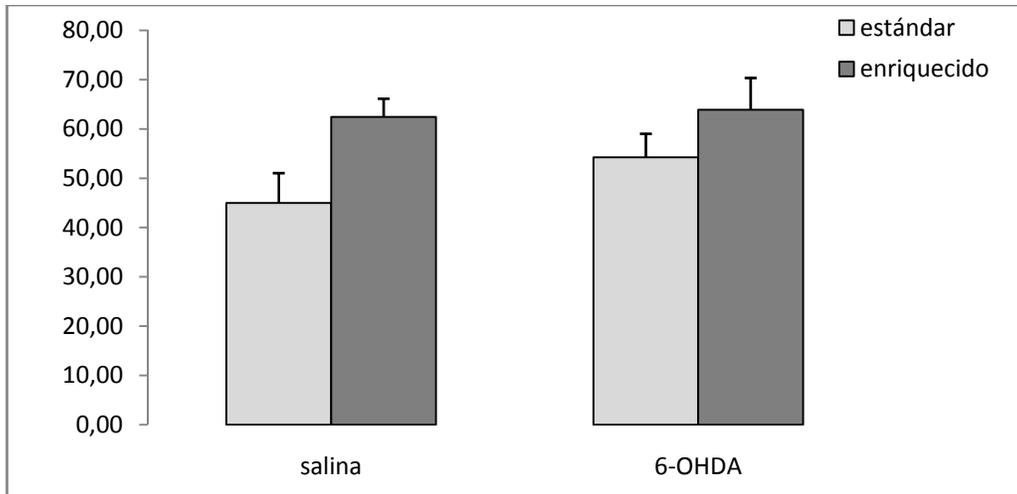


Figura 3: Ejecución durante el entrenamiento de los sujetos tratados con salina o con 6-OHDA en los dos tipos de ambiente.

La Figura 4 muestra la ejecución de los sujetos en el test de flexibilidad. Tampoco se encontraron diferencias en el test de flexibilidad ni para la condición de cirugía (toxina o ficticia; ($F[1,21]=0,317$; $P=0,580$), ni para el ambiente ($F[1,21]=2,575$; $P=0,124$). Tampoco fueron encontradas diferencias significativas para la interacción de los factores ($F[1,21]=0,0383$; $P=0,847$).

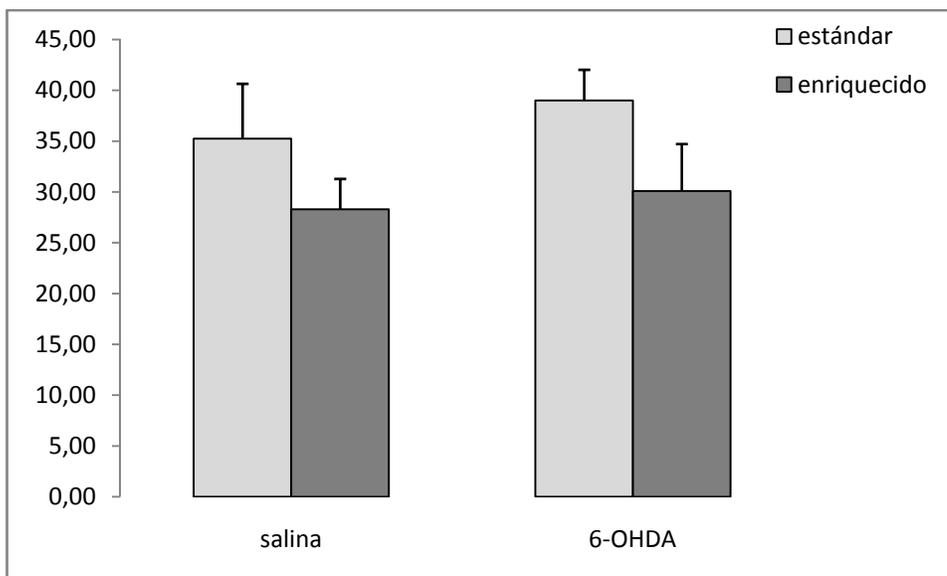


Figura 4: Ejecución durante la fase de flexibilidad de los sujetos tratados con salina o con 6-OHDA en los dos tipos de ambiente.

No se encontraron diferencias significativas en el número total de aciertos en las fases de entrenamiento y flexibilidad ni para la condición de cirugía (toxina o ficticia; ($F[1,21]=2,342$; $P=0,141$) ni para el ambiente ($F[1,21]=1,111$; $P=0,304$). Tampoco fueron encontradas diferencias significativas para la interacción de los factores ($F[1,21]=0,833$; $P=0,372$; ver Figura 5).

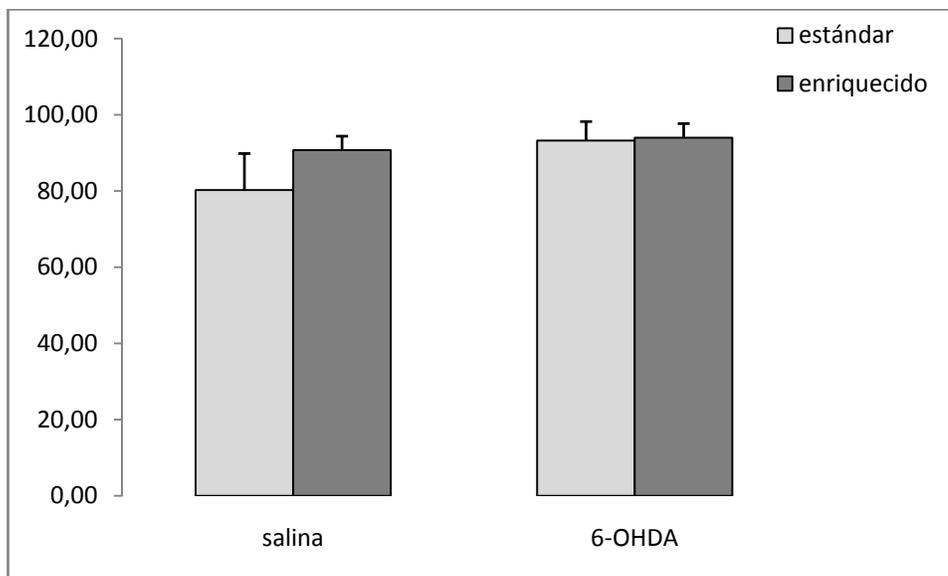


Figura 5: Total de aciertos durante las fases de entrenamiento y de flexibilidad para los sujetos tratados con salina o con 6-OHDA en los dos tipos de ambiente.

Peso sujetos por grupo: La Figura 6 muestra la media de los pesos para cada grupo en tres momentos distintos: peso inicial (PI), peso medio (PM) y peso final (PF). Para el grupo salina-estándar los pesos fueron (PI:390; PM:370; PF:280); para el grupo salina enriquecido fueron (PI:345; PM: 387,1; PF: 330); el toxina-estándar presento como resultado (PI:380, PM:380; PF:360) y el grupo toxina-enriquecido (PI:328,6; PM: 338,6; PF:336,0). No se observan

variaciones de importancia en los grupos Toxina en los cuales, teóricamente, podrían presentarse descensos importantes en el peso

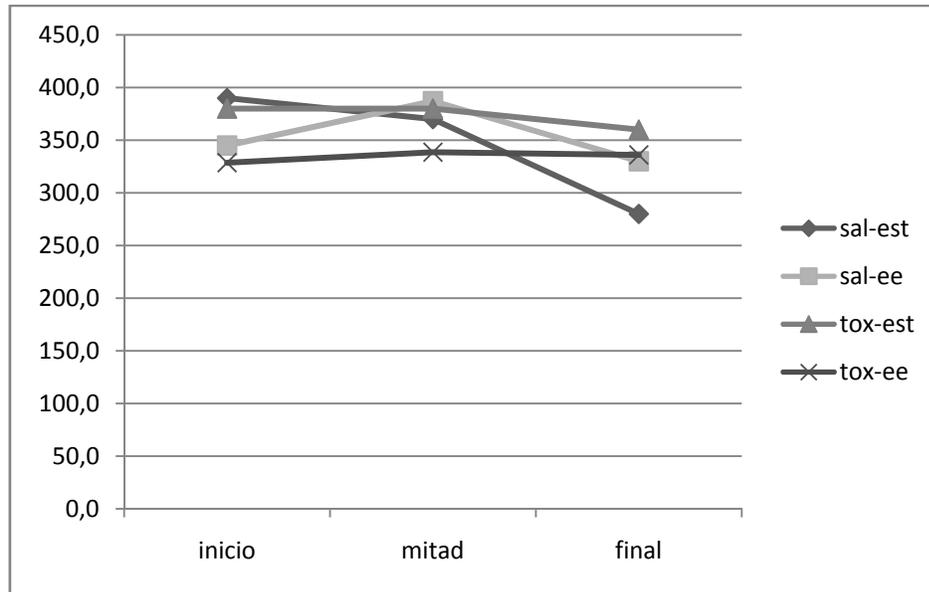


Figura 6: peso promedio de los sujetos en tres momentos distintos del proceso: inicial, medio y final

Discusión

La investigación sobre los efectos del AE en roedores ha sido fundamental en los estudios de plasticidad cerebral y conducta, incluyendo sus efectos terapéuticos sobre las enfermedades neurodegenerativas y la recuperación frente a las diferentes formas de daño cerebral (Laviola, Hannan, Macri, Solinas & Jaber, 2008). El objetivo de la presente investigación fue determinar la influencia de un ambiente enriquecido en la flexibilidad comportamental y los efectos neuroprotectivos en un modelo animal de Parkinson inducido por 6-OHDA. La aplicación de esta sustancia induce muerte de células dopaminérgicas en la SNc (Luquin, 2000). Los resultados obtenidos aquí indicaron que los sujetos a los cuales se les aplicó la toxina, efectivamente presentaron disminución marcada en la cantidad de neuronas en SNc sobrevivientes 41 días después de la lesión.

El conteo de células permitió evidenciar diferencias entre los grupos que recibieron toxina y los que recibieron salina lo que indica que el efecto obtenido en los sujetos con lesión es coherente con lo reportado en la teoría. No obstante, los datos obtenidos muestran que el porcentaje de muerte celular es del 69%, aspecto que aleja nuestros resultados de los hallazgos comúnmente reportados en la literatura. De hecho, Luquin (2000) afirma que la pérdida de células dopaminérgicas después de la cuarta semana es cercana al 90% y que porcentajes cercanos al 70% se presentan cuando la vía utilizada para inducir la lesión es inyección estriatal única (20 ug) o en infusión continua, lo que produce hipotéticamente muerte neuronal lenta y progresiva. Esta información también se corrobora en otros estudios (Ferro, Angelucci, Anselmo-Franci, Canteras & Da Cunha, 2007). Por ejemplo, los resultados del estudio realizado por Anastasia et al., (2009) muestran muerte de células dopaminérgicas en un porcentaje de 90,38% \pm 3,82. De esta manera, el porcentaje de pérdida (69%) de las células dopaminérgicas en la sustancia nigra obtenido aquí se encuentra por debajo de lo reportado en la literatura. Una posible explicación podría

encontrarse en el estudio realizado por Ferro et al., (2007) donde se investiga los efectos neuroprotectivos de la mezcla ketamina/xylazina como protocolo de anestesia para inducir Parkinson con MPTP o 6-OHDA. En su trabajo compararon dos grupos de ratas utilizando anestesia con ketamina/xylacina o Thiopental. Los resultados mostraron que las ratas anestesiadas con Thiopental evidenciaron pérdida de células dopaminérgicas en un 67% (MPTP) y 91% (6-OHDA), mientras que en las ratas anestesiadas con ketamina/xylacina las pérdidas fueron de 33% (MPTP) y 51% (6-OHDA). Adicionalmente, encontraron una menor reducción en los niveles de dopamina estriatal. Los investigadores concluyeron que las drogas con perfiles similares a la combinación ketamina/xylacina podrían ser exitosas en demorar la progresión de la EP. Esta investigación plantea una explicación posible al porcentaje de pérdidas reportado en el presente trabajo. Debido a que no se encontraron diferencias en el número de células en los sujetos sometidos a los dos tipos de ambiente, se debe descartar la posibilidad que su pérdida, menor a la esperada, haya sido efecto del tipo de ambiente.

Otra posibilidad se relaciona con la toxina misma. La consecución de la 6-OHDA implicó su traslado desde otro laboratorio, fuera de Bogotá (Grupo modelos experimentales para las ciencias zoológicas – Universidad del Tolima). Los cambios de clima, las condiciones de traslado, envasado y almacenamiento, podrían haber alterado su efectividad.

Otro elemento de gran importancia se relaciona con las manifestaciones motoras características de los modelos inducidos por 6-OHDA. Los resultados obtenidos mediante el test de suspensión mostraron diferencias significativas entre los sujetos tratados con toxina y con salina lo que permitió evidenciar el efecto de la toxina sobre el sistema nigroestriatal. Son variadas las estrategias que se utilizan para hacer evidentes los síntomas motores, entre ellas los tests de rotación inducida por anfetaminas o por apomorfina (Da Cunha, Wietzikoski, Ferro, Martinez, Vital, Hipolide, Tufik & Canteras, 2008; Anastasia et al., 2009),

el test de catalepsia (Ferro et al., 2005) y los tests de suspensión entre otros. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran coherencia con la literatura y la investigación realizada en este campo.

En relación con la tarea de flexibilidad, no se encontró información que soportara los resultados obtenidos en este trabajo. Como cabe recordar, la tarea de flexibilidad era posterior a un entrenamiento previo en una tarea de discriminación, luego de que el sujeto obtuviera un porcentaje de éxitos del 80%. Nuestros resultados muestran que no hubo diferencias significativas entre los grupos ni durante la etapa inicial de entrenamiento ni durante el test de flexibilidad, lo que confirma, para ambos casos, la hipótesis nula. Lo anterior plantea diversas preguntas sobre las razones por las cuales se dieron estos resultados, toda vez que, de acuerdo a las hipótesis planteadas, se esperaba que el ambiente enriquecido influyera en la ejecución de los sujetos en cualquiera de las condiciones (toxina o salina) en comparación con los sujetos de ambiente estándar. Esta hipótesis se basa en los hallazgos teóricos mencionados ampliamente en el marco conceptual, donde se plantean las múltiples ventajas del ambiente enriquecido sobre el estándar. De igual manera, se limita un poco la interpretación en la medida que no se encontró evidencia que apoye o desvirtúe los resultados obtenidos.

A pesar de ello, el análisis de la información lleva a plantear algunas explicaciones alternativas. En primer lugar, el criterio de efectividad para la tarea de comportamiento se cumplía una vez el sujeto lograba en una sesión ocho aciertos (80%). Esto implicaba que, independientemente del número de la sesión, una vez cumplido el criterio, el sujeto estaba habilitado para iniciar la tarea de flexibilidad. Esto pudo dejar espacio al azar en la medida que el sujeto, en una sesión particular, podría haber alcanzado el criterio sin hacer de forma consistente la tarea. Este aspecto se resolvería si se estableciese como criterio 80% de efectividad, no en una sesión, sino como promedio de algunas cuantas

sesiones, lo que aseguraría con mayor fiabilidad, el aprendizaje y la ejecución consistente de los sujetos experimentales en la tarea de discriminación.

Otro elemento tiene que ver con el número de sujetos para cada grupo. Como se mencionó en el procedimiento, la asignación de sujetos para los grupos de toxina fue mayor debido a los altos niveles de mortalidad esperada en este tipo de modelo, secundarios a la pérdida de peso posterior a la cirugía (Ferro et al., 2005). No obstante, las variaciones de peso esperadas no se presentaron en los grupos toxina y la muerte de los sujetos durante el experimento no se relacionó con este aspecto. Sin embargo, los sujetos perdidos (7) no fueron repuestos de inmediato, lo que dejó algunos grupos incompletos. De esta manera, el peso relativo de los datos estuvo en algunos de los grupos, particularmente aquellos que mantuvieron el número de sujetos estable o cercano al planteado inicialmente.

La naturaleza de la tarea ha sido analizada como otro factor que pudo influir en los resultados. Teniendo en cuenta que el interés de la investigación se relacionaba con los síntomas cognitivos y no los motores, se buscó que la tarea no se viera afectada por las manifestaciones que típicamente se dan en este tipo de lesiones. Cabe resaltar que uno de los aportes metodológicos de gran importancia en nuestra investigación, fue la utilización de una tarea que no implicara habilidades motrices. De esta manera se pudo garantizar que la ejecución no estuviera contaminada por las dificultades motoras ocasionadas por la lesión. En la literatura, los modelos encontrados para el abordaje de los procesos cognitivos implican regularmente tareas que, de una u otra forma, requieren habilidades motrices, lo que puede llevar a la aceptación de falsos positivos. Por ejemplo, en los estudios donde se aborda memoria utilizando el laberinto acuático de Morris, uno de los criterios para determinar la calidad de la memoria es la latencia de los sujetos controles y los lesionados. Sin embargo, la ejecución de los sujetos se puede ver afectada por el componente motor y no

por el deterioro en memoria, lo que plantearía la pregunta de si el modelo, permite evidenciar dificultades cognitivas.

Un elemento adicional fue la dificultad para realizar la inmunohistoquímica, tanto en el procedimiento, como en el número de sujetos incluidos. La consecución del anticuerpo original (con el cual se planificó la investigación) no fue posible, lo que obligó a cambiar de Tiroxina Hidroxilasa a NeuN, por ser el anticuerpo disponible para realizar el procedimiento. El laboratorio donde había disponibilidad de NeuN fue el del Instituto Nacional de Salud (INS) lo que obligó a realizar la inmunohistoquímica en un lugar distinto y por personal ajeno a los investigadores principales, algo que pudo influir en los resultados finales. También se presentaron dificultades con el número de cerebros incluidos. Teniendo en cuenta que se estaba trabajando con recursos de otro laboratorio, el número de cerebros incluidos en el procedimiento fue bajo (8) lo que disminuyó la cantidad de datos para incluir en el análisis estadístico. Adicionalmente, después de realizar el conteo de células, uno de los cerebros tuvo que ser descartado por cuanto los resultados no eran consistentes con lo esperado de acuerdo a la condición (6-OHDA).

Finalmente, se podría plantear la posibilidad de que un modelo animal de Parkinson inducido por 6-OHDA no genere afectación en la flexibilidad lo que llevaría a proponer que el modelo no es adecuado para abordar este proceso cognitivo. Sin embargo, esta es una posibilidad que por supuesto, debe apoyarse conceptual y empíricamente. Es fundamental resaltar que todos los resultados previos son preliminares, esto teniendo en cuenta que la investigación fue dividida en dos fases, la primera de las cuales es presentada en este escrito.

Conclusiones

El análisis de la información obtenida, a la luz de los objetivos y las hipótesis propuestas para la investigación, plantean varias conclusiones:

1. El objetivo general fue cumplido aunque la relación entre las variables no haya mostrado diferencias significativas.
2. Con la finalidad de determinar si la poca muerte neuronal se debió al posible efecto de protección de la anestesia con ketamina/xylacina, se hace necesario replicar la investigación utilizando algún otro anestésico tal como Thiopental
3. Habría que cambiar el criterio de efectividad en el entrenamiento de 80% de efectividad en una sesión a 80% de efectividad promedio en sesiones posteriores al aprendizaje
4. Es completamente necesario completar los grupos para equilibrar el peso relativo de las condiciones y los ambientes

Referencias

- Akerud, P., Canals, J. M., Snyder, E. Y., & Arenas, E. (2001). Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J.Neurosci.*, *21*, 8108-8118.
- Amaya, N., Caballero, M., Gómez, A., Martínez, D., & Quintero, A. (2010). *ENFERMEDAD DE PARKINSON Y ALTERACIONES COGNITIVAS ASOCIADAS: UN ESTUDIO DE CASO*. Universidad de San Buenaventura.
- Anastasia, A., Torre, L., de Erausquin, G. A., & Masco, D. H. (2009). Enriched environment protects the nigrostriatal dopaminergic system and induces astroglial reaction in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *J.Neurochem.*, *109*, 755-765.
- Arnaiz, S. L., D'Amico, G., Paglia, N., Arismendi, M., Basso, N., & Rosario Lores, A. M. (2004). Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition. *Mol.Aspects Med.*, *25*, 91-101.
- Bellissimo, M. I., Kouzmine, I., Ferro, M. M., de Oliveira, B. H., Canteras, N. S., & Da Cunha, C. (2004). Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? *Neurobiol.Learn.Mem.*, *82*, 150-158.
- Ben, V. & Bruguerolle, B. (2000). Effects of bilateral striatal 6-OHDA lesions on circadian rhythms in the rat: a radiotelemetric study. *Life Sci.*, *67*, 1549-1558.
- Bezard, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. et al. (2003). Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J.Neurosci.*, *23*, 10999-11007.
- Bosboom, J. L., Stoffers, D., & Wolters, E. C. (2004). Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J.Neural Transm.*, *111*, 1303-1315.

- Boulamery, A., Simon, N., Vidal, J., & Bruguierolle, B. (2010). Effects of L-Dopa on circadian rhythms of 6-OHDA striatal lesioned rats: a radiotelemetric study. *Chronobiol.Int.*, *27*, 251-264.
- Bove, J., Serrats, J., Mengod, G., Cortes, R., Tolosa, E., & Marin, C. (2005). Neuroprotection induced by the adenosine A2A antagonist CSC in the 6-OHDA rat model of parkinsonism: effect on the activity of striatal output pathways. *Exp.Brain Res.*, *165*, 362-374.
- Cao, X., Huang, S., & Ruan, D. (2008). Enriched environment restores impaired hippocampal long-term potentiation and water maze performance induced by developmental lead exposure in rats. *Dev.Psychobiol.*, *50*, 307-313.
- Da Cunha, C., Angelucci, M. E., Canteras, N. S., Wonnacott, S., & Takahashi, R. N. (2002). The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell Mol.Neurobiol.*, *22*, 227-237.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, E. C., Bortolanza, M., Dombrowski, P. A., Dos Santos, L. M., Boschen, S. L. et al. (2009). Non-motor function of the midbrain dopaminergic neurons. *J.Neural Transm.Suppl.*, 147-160.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, E. C., Ferro, M. M., Martinez, G. R., Vital, M. A., Hipolide, D. et al. (2008). Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. *Behav.Brain Res.*, *189*, 364-372.
- Darvas, M. & Palmiter, R. D. (2011). Contributions of striatal dopamine signaling to the modulation of cognitive flexibility. *Biol.Psychiatry*, *69*, 704-707.
- De Leonibus, E., Manago, F., Giordani, F., Petrosino, F., Lopez, S., Oliverio, A. et al. (2009). Metabotropic glutamate receptors 5 blockade reverses spatial memory deficits in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, *34*, 729-738.
- De Leonibus, E., Pascucci, T., Lopez, S., Oliverio, A., Amalric, M., & Mele, A. (2007). Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. *Psychopharmacology (Berl)*, *194*, 517-525.
- Faherty, C. J., Raviie, S. K., Herasimtschuk, A., & Smeyne, R. J. (2005). Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, *134*, 170-179.

- Ferro, M. M., Angelucci, M. E., Anselmo-Franci, J. A., Canteras, N. S., & Da Cunha, C. (2007). Neuroprotective effect of ketamine/xylazine on two rat models of Parkinson's disease. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, *40*, 89-96.
- Ferro, M. M., Bellissimo, M. I., Anselmo-Franci, J. A., Angellucci, M. E., Canteras, N. S., & Da Cunha, C. (2005). Comparison of bilaterally 6-OHDA and MPTP in animal model of Parkinson Disease. *J.Neurosci.Methods*, *148*, 78-87.
- Glinka, Y. Y. & Youdim, M. B. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur.J.Pharmacol.*, *292*, 329-332.
- Grahn, J. A., Parkinson, J. A., & Owen, A. M. (2009). The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. *Behav.Brain Res.*, *199*, 53-60.
- Haik, K. L., Shear, D. A., Hargrove, C., Patton, J., Mazei-Robison, M., Sandstrom, M. I. et al. (2008). 7-nitroindazole attenuates 6-hydroxydopamine-induced spatial learning deficits and dopamine neuron loss in a presymptomatic animal model of Parkinson's disease. *Exp.Clin.Psychopharmacol.*, *16*, 178-189.
- Huang, R., Han, L., Li, J., Ren, F., Ke, W., Jiang, C. et al. (2009). Neuroprotection in a 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson model using lactoferrin-modified nanoparticles. *J.Gene Med.*, *11*, 754-763.
- Jadavji, N. M., Kolb, B., & Metz, G. A. (2006). Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. *Neuroscience*, *140*, 1127-1138.
- Jonsson, G. (1976). Studies on the mechanisms of 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *Med.Biol.*, *54*, 406-420.
- Jonsson, G. & Sachs, C. (1970). Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur.J.Pharmacol.*, *9*, 141-155.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. C., & Jessell, T. (2000). *Principles of Neural Science*. (4 ed.) New York: McGraw Hill.
- Laviola, G., Hannan, A. J., Macri, S., Solinas, M., & Jaber, M. (2008). Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol.Dis.*, *31*, 159-168.

- Lewis, S. J., Dove, A., Robbins, T. W., Barker, R. A., & Owen, A. M. (2003). Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry. *J.Neurosci.*, *23*, 6351-6356.
- Li, L. & Tang, B. L. (2005). Environmental enrichment and neurodegenerative diseases. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *334*, 293-297.
- Luquin, M. R. (2000). Modelos experimentales de enfermedad de Parkinson. *Revista de Neurología*, *31*, 60-66.
- Manciocco, A., Chiarotti, F., Vitale, A., Calamandrei, G., Laviola, G., & Alleva, E. (2009). The application of Russell and Burch 3R principle in rodent models of neurodegenerative disease: the case of Parkinson's disease. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, *33*, 18-32.
- Montoya, A., Price, B. H., Menear, M., & Lepage, M. (2006). Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease. *J.Psychiatry Neurosci.*, *31*, 21-29.
- Mora, F., Segovia, G., & Del Arco, A. (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res.Rev.*, *55*, 78-88.
- Oiwa, Y., Yoshimura, R., Nakai, K., & Itakura, T. (2002). Dopaminergic neuroprotection and regeneration by neurturin assessed by using behavioral, biochemical and histochemical measurements in a model of progressive Parkinson's disease. *Brain Res.*, *947*, 271-283.
- Polazzi, E., Altamira, L. E., Eleuteri, S., Barbaro, R., Casadio, C., Contestabile, A. et al. (2009). Neuroprotection of microglial conditioned medium on 6-hydroxydopamine-induced neuronal death: role of transforming growth factor beta-2. *J.Neurochem.*, *110*, 545-556.
- Pradilla, G., Vesga, B., León-Sarmiento, F., & GENECO, G. (2003). Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *14*, 104-111.
- Rampon, C., Jiang, C. H., Dong, H., Tang, Y. P., Lockhart, D. J., Schultz, P. G. et al. (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *97*, 12880-12884.

- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., & Tsien, J. Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.*, 3, 238-244.
- Rodríguez-Constela, I., Cabo-López, I., Bellas-Lamas, P., & Cebrián, E. (2010). Transtornos cognitivos y neuropsiquiátricos en la enfermedad de Parkinson. *Revista de Neurología*, 50, 33-39.
- Sharma, R., McMillan, C. R., Tenn, C. C., & Niles, L. P. (2006). Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res.*, 1068, 230-236.
- Tadaiesky, M. T., Dombrowski, P. A., Figueiredo, C. P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C., & Takahashi, R. N. (2008). Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 156, 830-840.