

**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,
MENCIÓN NEUROCIENCIAS**

**EFECTOS MOTORES DE LA ESTIMULACIÓN
ELECTRICA NO-INVASIVA DE LA MEDULA ESPINAL EN
MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD DE PARKINSON**

SEBASTIÁN ANDRÉS GALLEGOS BERRIOS

**Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, Mención
Neurociencias**

Director de Tesis:

Prof. Dr. Pablo Moya

Co-Director de Tesis:

Prof. Dr. Rómulo Fuentes

Valparaíso, Mayo 2019

ÍNDICE

1. Resumen	4
<hr/>	
2. Introducción	5
2.1. Enfermedad de Parkinson	5
2.1.1. Antecedentes	5
2.1.2. Características neuropatológicas y neuroquímicas	6
2.1.3. Tratamiento farmacológico convencional	9
2.2. Estimulación Cerebral Profunda	11
2.3. Estimulación Medular Epidural	12
2.4. Estimulación Eléctrica no invasiva de la Médula Espinal.	14
<hr/>	
3. Hipótesis	16
<hr/>	
4. Objetivos	16
4.1. Objetivo General	16
4.1.1. Objetivos específicos	16
<hr/>	
5. Metodología	17
5.1. Animales	17
5.2. Definición de Parámetros	17
5.3. Diseño Experimental	18
5.4. Modelo lesión de 6-OHDA unilateral	20
5.5. Pruebas Motoras	21
5.5.1. Test del Cilindro	21
5.5.2. Test del Rotámero	22
5.6. Control de Peso Corporal	22
5.7. Inmunohistoquímica	23
5.8. Cálculo y Análisis Estadístico	24
<hr/>	
6. Resultados	25
6.1. Pruebas Motoras	25
6.1.1. Test del Cilindro	25
6.1.2. Test del Rotámero	27

6.2. Control de Peso Corporal	29
6.3. Inmunohistoquímica	31
<hr/>	
7. Discusión	33
<hr/>	
8. Bibliografía	39
<hr/>	

1. RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa, multifactorial, de gran incidencia en la población y afecta principalmente a los adultos mayores. La EP se caracteriza por una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal. La presentación clínica de la EP se manifiesta principalmente a través de síntomas motores, pero también no motores. En el primer grupo, podemos reconocer la bradiquinesia, temblor en reposo, y alteraciones de la postura y marcha. En el segundo grupo, podemos reconocer diversos síntomas, como trastornos neuropsiquiátricos, alteración del sueño, disautonomías, disfunciones sensoriales, dolor y fatiga. Actualmente, existe un tratamiento convencional usado por décadas que ha permitido mejorar los síntomas motores, el que sin embargo conlleva efectos secundarios como la discinesia y complicaciones motoras a largo plazo. Ante ello, se han desarrollado nuevas estrategias para complementar o mejorar el tratamiento actual, algunas de ellas basadas en herramientas con efectos positivos en patologías como la epilepsia y el manejo del dolor. Es así, como el tratamiento de la EP ha evolucionado y se ha llegado a la estimulación cerebral profunda (procedimiento aprobado por la FDA), demostrando resultados eficaces en síntomas motores. Posteriormente, se desarrolló la estimulación epidural, el cual ha demostrado una mejoría de los síntomas motores. Sin embargo, éstas aún son técnicas invasivas que requieren el implante de dispositivos de estimulación mediante cirugía, por lo que objetivo de este estudio es poder descubrir los efectos motores que tendría la estimulación eléctrica no invasiva de la médula espinal. Se evaluó el impacto de la estimulación no-invasiva en un modelo parkinsoniano en ratas con lesión estriatal unilateral con 6-hidroxidopamina. Se encontraron diferencias en el desempeño de pruebas motoras como el rotámetro, en el peso corporal y en resultados de inmunohistoquímica, que sugieren mayor preservación de las neuronas marcadas con TH. Estos resultados ofrecen soporte a la estimulación eléctrica no invasiva como una potencial alternativa terapéutica para el manejo de la EP.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON

2.1.1. ANTECEDENTES

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal[1-3] (Fig. 1). La EP es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la Enfermedad de Alzheimer[4], con una prevalencia estimada cercana al 1-2% en adultos sobre 60 años de edad y aumentando al 4% en mayores de 80 años [3, 5]

No existe una relación específica con los factores que provocan la EP; sin embargo, se han logrado identificar componentes ambientales y genéticos [6-8] que favorecen el desarrollo de esta enfermedad, aunque existen múltiples causas que provocan esta degeneración neuronal. En la clínica, la EP se ha caracterizado por el desarrollo de complicaciones motoras observándose a través de fluctuaciones motoras, discinesias y síntomas no motores [1, 2, 7, 9].

Los signos cardinales de la EP son temblor en reposo, rigidez, bradiquinesia/hipocinesia/acinesia, postura en flexión de cuello, tronco y extremidades, pérdida de reflejos posturales y fenómeno de “congelamiento” [7, 10]. Comúnmente, se ve acompañado de síntomas no motores caracterizados por cuadros neuropsiquiátricos, los cuales afectan la calidad de vida[11]; entre ellos reconocemos la ansiedad, depresión, alucinaciones, desorden de control de impulso y déficit cognitivo[1-3, 5]. Además se

presentan disfunciones autonómicas, provocando complicaciones gastrointestinales ,
urinarias, sexuales, trastornos sensitivos y del sueño [2, 5].

En la clínica, se puede evaluar el avance de los síntomas antes mencionados a través de la
pauta UPDRS [12, 13], que permite diagnosticar precozmente los síntomas parkinsonianos,
siendo utilizado como un instrumento de tamizaje, explorando aspectos motores,
cognitivos, del ánimo, del lenguaje, actividades de la vida diaria y complicaciones del
tratamiento.[12]

2.1.2. CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS Y NEUROQUÍMICAS

La EP se caracteriza por la pérdida de células dopaminérgicas en la Pars Compacta de la
Sustancia Nigra (SNpc)[3]; dichas células proyectan principalmente hacia el cuerpo
estriado. Esta degeneración de las neuronas dopaminérgicas se caracteriza por tener un
inicio en el axón y terminales sinápticos, progresando de forma retrógrada hacia el soma de
la sustancia nigra (SN) [14]. Esta degeneración está precedida por deficiencias en la
liberación y recaptación de dopamina por parte de los terminales presinápticos [15].

Por lo tanto, se produce una disminución de la producción de dopamina en la vía
nigroestriatal [9, 16-20], afectando el normal funcionamiento y equilibrio de la vías directa
e indirecta de los núcleos de la base, una de las principales estructuras encargadas de la
inhibición, selección, inicio,y producción de los movimientos[1, 20]. Una disminución en
producción de la dopamina favorece la activación de la vía indirecta por sobre la directa,
provocando una limitación en la generación del movimiento y por lo tanto, provocando los

síntomas propios de la EP antes mencionados [21-23]. Por otro lado, si hay un desequilibrio o alteración a favor de la vía directa, esto provocará síntomas hiperkinéticos[6].

Al existir una disminución de actividad en la vía nigroestriatal, se refuerza la cascada inhibitoria del globo pálido interno hacia el tálamo y en consecuencia, de la corteza, desfavoreciendo así el inicio de los movimientos.[17]

Esta limitación se observa en la clínica a través de los síntomas motores cardinales[7]. Dicha observación se hace evidente frente a la pérdida del 60% de las neuronas dopaminérgicas, que resulta en una disminución del 80% de la dopamina disponible en el estriado [24].

Este modelo clásico de la neuropatología sería más complejo que el proceso de neurodegeneración, estaría acompañado de un correlato neurofisiológico, lo que indicaría una alteración en el patrón rítmico de descarga neuronal que determinaría la función patológica [42, 43] .

Las neuronas en forma individual, poblaciones neuronales locales y/o múltiples conjuntos de neuronas distribuidas a través de las regiones del cerebro a menudo muestran actividad rítmica en el tiempo, llamado de oscilación. Las oscilaciones neuronales son un mecanismo esencial para que la actividad coordinada durante el funcionamiento normal del cerebro. Las oscilaciones se pueden observar en todos los niveles de medición, por ejemplo, a partir de una sola neurona, los potenciales de campo locales (LFPs) y grabaciones cerebrales a gran escala, como el electroencefalograma (EEG) [46, 47, 48]. Cualquier oscilación puede ser descrito como una combinación de ondas sinusoidales con diferentes frecuencias (ciclos por Segundo o Hertz), amplitudes, y la fase. Este marco da lugar a varios enfoques analíticos y las medidas que se utilizan comúnmente, tales como: sincronía y coherencia.

La sincronía mide la relación entre las estructuras temporales de las señales, independientemente de la amplitud de la señal. Dos señales, grabadas simultáneamente desde diferentes sitios, se consideran ser sincrónicas si sus ritmos coinciden. La coherencia se define por la covarianza de la amplitud de las oscilaciones grabadas desde diferentes sitios para las diversas bandas de frecuencia. Las oscilaciones neuronales suelen dividirse en diferentes tipos en función de su frecuencia y el lugar específico, como theta (2-7 Hz), alfa (7-13 Hz en la corteza visual), beta (11-30 Hz), gamma (30 Hz -80), y mu (7-12 Hz, sensoriomotor).

Las oscilaciones neuronales se correlacionan no solo con una serie de procesos fisiológicos, tales como los ritmos circadianos, la memoria, la atención y la marcha, sino también con varios eventos patológicos. Recientemente, los estudios en animales y humanos han demostrado la existencia de diferentes tipos de actividad oscilatoria en los diversos núcleos de los núcleos de la base. Estas actividades podrían desempeñar un papel importante tanto en la fisiología normal y la fisiopatología de este sistema [46, 47, 48]. Antes y durante el movimiento voluntario, el núcleo subtalámico (STN), globo pálido interno (GPI) y la corteza forman una red funcional de largo alcance que resuena a 60-80 Hz [39, 42]. Este rango de frecuencia ha demostrado ser procinético, por el contrario, las frecuencias de aproximadamente 11 a 30 Hz y 3 a 10 Hz se considera que son predominantemente anticinéticos. [47] En la EP se ha descrito una sincronización excesiva a una frecuencia inferior en los ganglios basales circuito cortical. De hecho, los animales y los estudios en humanos han demostrado una actividad oscilatoria sincronizada de forma anormal en la banda beta (entre 8 -30 Hz) en múltiples niveles en el circuito del motor voluntario. En modelos animales, como primates tratados con MTPT, mostraron una oscilación sincrónica,

en el que se encontró potencia máxima para estar en 10 -12 Hz. [48] La oscilación en GPI se redujo significativamente con la terapia de reemplazo de la dopamina y la estimulación cerebral profunda (DBS) [42, 43]]. Al mismo tiempo, este tratamiento ha logrado el control síntomas motores. Este efecto es compatible con una estrecha relación entre la sincronización y la fisiopatología de los síntomas de Parkinson. En otro modelo animal tal como el 6-hidroxidopamina (6-OHDA) mostraron que la denervación dopaminérgica con plomo en ratas lesionadas tuvieron un aumento significativo en el poder y la coherencia de la actividad oscilatoria de frecuencia beta que se encuentra en la LFP. La administración de un agonista del receptor de dopamina produce una supresión de oscilaciones de frecuencia beta. En los registro de LFP, en los pacientes con EP han revelado consistentemente oscilaciones prominentes entre 8 Hz y 30 Hz [44, 45, 46]. Esta sincronización excesiva se ha observado en todo el circuito ganglios basales-cortical, y de manera similar a los modelos animales de esta actividad es suprimida por el tratamiento con fármacos dopaminérgicos y de alta frecuencia DBS en paralelo con la mejoría clínica. [49]

2.1.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CONVENCIONAL

El tratamiento farmacológico se ha enfocado principalmente al aumento de la disponibilidad de dopamina a través de la administración de un precursor de dicho neurotransmisor, conocido como L-Dopa (levodopa) [1, 2].

Al contrario de la levodopa, la dopamina no logra permear la barrera hematoencefálica, lo que no permite su uso oral como tratamiento de la EP[25].

La levodopa se transforma en dopamina a través de la acción de la dopa-decarbolixasa (DDC). Esta conversión es eficiente; sin embargo, el aumento del neurotransmisor también provoca múltiples y frecuentes efectos adversos [26].

Durante 40 años, la levodopa sigue siendo la droga fundamental para el tratamiento de la EP, su efectividad ha sido confirmada por diversos estudios [26-32]. Durante su uso, pacientes reportan un mejoramiento de la calidad de vida [26] e incluso reduciendo la mortalidad asociada en esta población[33].

Teniendo en cuenta que la dopamina participa en diversas funciones a nivel de todo el sistema nervioso, es necesario asociarlo con un inhibidor de la DDC [25, 34], ya que sin éste, la levodopa genera solo que el 5% alcance el sistema nervioso central. La presentación es conocida como carbidopa y se utiliza en una proporción levodopa/carbidopa 10:1. También se utiliza la benserazida con un efecto similar, utilizando una proporción 4:1. (REF)

El efecto de la levodopa se debe a la síntesis de dopamina en la neurona, la que una vez liberada, activa receptores dopaminérgicos [25, 30]. Este efecto permite una disminución de las manifestaciones motoras propias de la EP. Sin embargo, aproximadamente a los 5 años de tratamiento el 40% de los pacientes manifiestan complicaciones[7], por la disminución de la duración de los efectos y por la aparición de movimientos involuntarios (discinesias) [7, 27, 29, 32, 34-37]. Sumado a estos efectos motores adversos, también está documentada una muerte neuronal acelerada, postulando que pudiera ser tóxico para las neuronas remanentes en EP [37].

2.2 ESTIMULACIÓN CEREBRAL PROFUNDA

La degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la vía nigro-estriatal produce una serie de trastornos motores y cognitivos que progresan con el tiempo[7]. Debido a los efectos limitados de la levodopa se ha buscado nuevas estrategias terapéuticas que complementen este tratamiento. Según lo revisado previamente podríamos encontrar una correlación entre la degeneración dopaminérgica que estaría asociada con un patrón de sincronización oscilatoria en el circuito cortical-ganglios basales [38, 39].

Como una forma de aproximación terapéutica se ha observado que la estimulación profunda en núcleos subtalámicos se ha convertido en un tratamiento eficaz para la EP [40-44].

Diversos estudios han demostrado que la estimulación cerebral profunda[45] (DBS, su sigla en inglés por *Deep Brain Stimulation*) mejora el desempeño en síntomas motores cardinales como la inestabilidad postural, temblor y bradiscinesia.[41, 46]. Hay evidencia de que puede existir un empeoramiento de los síntomas cardinales después del DBS; sin embargo, esto estaría asociado a múltiples factores y la progresión de la patología.

Diversas hipótesis podrían explicar los efectos terapéuticos de la DBS sobre la EP [45], entre ellos la inhibición indirecta que realiza sobre otras estructuras. Por otra parte, la estimulación de alta frecuencia podría regularizar la actividad entre núcleo subtalámico y globo pálido interno, y en tercer lugar, la alta frecuencia y actividad del DBS podría inducir la amplificación de señales del sistema necesario para el movimiento normal [45, 47].

A pesar de que existen múltiples beneficios de este tratamiento, cabe señalar que las complicaciones y riesgos de la DBS son importantes,[48-50], dichas complicaciones relacionadas con DBS pueden ocurrir durante el procedimiento, inmediatamente después de

la cirugía o incluso muchos años después de la implantación. Las complicaciones de la DBS pueden estar asociadas a complicaciones relacionadas con la cirugía, complicaciones relacionadas con el hardware y complicaciones relacionadas con la estimulación. [52]. Además de ser un tratamiento invasivo, la selección de los pacientes es muy específica, ya que requiere de una condición social y cognitiva que lo permita, siendo en general aplicable a tan solo un 1,6% de los pacientes cumpliendo estrictamente los criterios de inclusión y al momento de flexibilizar los criterios, el porcentaje de elegibilidad aumentó un 4,5% [53]. Los mecanismos subyacentes a este efecto terapéutico podrían estar relacionados con la desincronización de la actividad neuronal dentro de los circuitos de ganglios corticobasales y la reducción global de la coherencia entre estas estructuras en la llamada frecuencia beta (8-30 Hz).

2.3 ESTIMULACIÓN MEDULAR EPIDURAL

La Estimulación Medular Epidural se está convirtiendo en una aproximación terapéutica válida para el tratamiento de los síntomas motores del Parkinson resistentes al tratamiento farmacológico convencional.

Esta técnica se ha desarrollado desde la década de los 60's donde se utilizó la estimulación eléctrica de los cordones dorsales de la médula espinal (DCS) para el tratamiento del dolor crónico. En los años 70 se realizó la estimulación en cordones dorales a nivel C1-C2 con alta frecuencia para el tratamiento de la torticollis espasmódica, sin embargo, los resultados fueron concluyentes. Luego, y después de los hallazgos experimentales originales en modelos animales de EP a fines de la década de 2000, varios estudios preliminares han

informado los efectos clínicos beneficiosos de la DCS en pacientes con EP. Los efectos de la DCS no solo son significativos en los síntomas motores como la acinesia, la bradicinesia y el temblor, sino que también proporcionan un alivio significativo de los síntomas axiales, la marcha y el deterioro de la postura y el “congelamiento” [55-60]., una variedad de problemas que son difíciles de tratar con la terapia terapéutica actual. La evidencia experimental actual sugiere que la DCS modula la actividad de las estructuras subcorticales y corticales activando las fibras de CC ascendentes de la médula espinal. Aunque el mecanismo preciso aún no está claro, el DCS continuo de alta frecuencia parece interrumpir la activación neuronal sincronizada de baja frecuencia patológica observada en los núcleos de la base y la corteza motora, que se ha asociado con la EP. De hecho, los efectos neurofisiológicos observados con DCS en animales experimentales imitan a los observados durante la terapia de reemplazo de dopamina. Además, en roedores, la DCS también ha producido un efecto protector a largo plazo en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, lo que la convierte en una opción de tratamiento prometedora para la EP en etapa temprana junto con la terapia tradicional con levodopa.

Este tratamiento incluiría mejoras instantáneas, que se han asociado a la desincronización de oscilaciones en baja frecuencia a través del circuito formado por la corteza, núcleos de la base y núcleos subtalámicos [59, 61]. Estudios posteriores, que midieron los efectos a largo plazo, describieron mejoras sostenidas en el tiempo.[61, 62]

Esta recuperación funcional observada en modelos animales fue acompañado de una interrupción de las oscilaciones de baja frecuencia aberrantes presentes en la corteza y los núcleos de la base, lo que lleva a la aparición de patrones de actividad neuronal que se asemejan al estado normalmente precede la iniciación espontánea de movimiento.

Fuentes y cols, en diversos estudios [55, 56] ha demostrado que esta técnica ha permitido un mejoramiento en funciones de locomoción en un modelo animal. Además, Fenelon y cols, han reportado resultados en pacientes humanos utilizando esta técnica, mejorando los signos motores e incrementando en un 47,6% el puntaje del UPDRS [63].

Estas experiencias han demostrado que la implantación de electrodos y estimulación sobre la médula espinal provoca una mejora en síntomas motores, y que se relacionaría con una disminución en la sincronización de las oscilaciones en baja frecuencias a nivel cortical [56]; dicha sincronía estaría relacionada con la presencia de estos signos motores propios de la EP.

Las pruebas disponibles a partir de los estudios en modelo animal y casos clínicos en humanos, apoyan la técnica, teniendo efectos terapéuticos agudos y de largo plazo sobre síntomas motores de la EP.

2.4 ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA NO INVASIVA DE LA MÉDULA ESPINAL

En la búsqueda de nuevos blancos, se ha desarrollado una técnica de estimulación medular no invasiva. Teniendo la consideración de ser una técnica no invasiva, segura, y que permite la modulación de la excitabilidad corticoespinal. Es así como Bocci y cols., [64-66] a través de su protocolo de estimulación transcutánea logró comprobar cambios sobre la excitabilidad de los tractos corticoespinales, y sugiere que esta estimulación logra un cambio a nivel cortical, pudiendo tener un impacto sobre las oscilaciones aberrantes presentes en la EP.

Otro grupo italiano, Cogiamanian y cols, [67-69] estudió como la estimulación transcutánea modula la actividad en los sistemas lenmiscal, espinotalámico y motor. Modulando la excitabilidad de la médula, postula a esta técnica como una herramienta complementaria a diversas patologías, incluyendo el dolor [67]. El mecanismo de funcionamiento estaría asociado a la neuromodulación de las oscilaciones a nivel de la corteza somatosensorial, esta técnica también se ha utilizado para la remodelación de proyecciones cortico espinales y también se sabe que causa cambios en la expresión de los genes en las vías ascendentes. Esto sugiere que la estimulación eléctrica da lugar a una señal que se transmite en múltiples áreas corticales y subcorticales de gran interés , desde el punto de vista terapéutico, en el cerebro humano [70].

Dado los antecedentes aquí propuestos respecto a EP y la evidencia de la potencial efectividad de esta técnica, es posible considerar que esta forma de estimulación no invasiva podría sugerirse como una estrategia segura y efectiva sobre los signos motores de la EP. Al respecto, nos propusimos evaluar si es posible reproducir dichos hallazgos en un modelo parkinsoniano animal ampliamente estudiado como es la hemilesión con la toxina 6-OHDA, e indagar sobre los posible mecanismos que subyacen al potencial efecto benéfico de dicho tratamiento a través de pruebas motoras, recuperación de peso y técnicas histológica.

3 HIPÓTESIS

La estimulación eléctrica no invasiva de la médula espinal produce mejoras en síntomas motores en modelo de ratas parkinsonianas a través de un mecanismo de un mecanismo de neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas.

4 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

4.1 Evaluar los efectos motores de las estimulación eléctrica no invasiva de la médula espinal en modelo de ratas parkinsonianas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1.1 Diseñar sistema de estimulación eléctrica no invasiva de la médula espinal.

4.1.2 Reproducir el modelo de ratas parkinsonianas.

4.1.3 Evaluar los efectos motores del protocolo de estimulación no invasiva de la médula espinal en modelo de ratas parkinsonianas.

4.1.4. Comprobar el efecto de la lesión con 6-OHDA sobre células dopaminérgicas de la vía nigroestriatal en ratas parkinsonianas.

4.1.5 Cuantificar neuronas dopaminérgicas en sustancia nigra y proyecciones a estriado.

-

5 METODOLOGÍA

5.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos adultos (Día postnatal 60); mantenidas a temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (50 %) controlada, bajo ciclos luz-oscuridad invertido (12:12 horas). Los animales tuvieron disponibilidad de comida y agua *ad libitum*. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para reducir al mínimo el número de animales utilizados en éste proyecto y evitar su sufrimiento. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, protocolo CBA 0954 FMUCH.

5.1 DEFINICIÓN DE PARÁMETROS

Previo a la realización del diseño experimental, fue necesario llevar a cabo la definición de los parámetros de estimulación. De acuerdo a la literatura, existe una relación entre el desempeño motor y la actividad beta oscilatoria (8-30 Hz), observada en el potencial de campo local. Por lo tanto, se llevó a cabo un registro electrofisiológico *in vivo* en los siguientes núcleos: estriado dorsal, núcleos posterolateral ventral, corteza somatosensorial primaria y corteza motora primaria. Este registro se llevó a cabo a través de un implante en tres ratas, a las que previamente se les aplicó el modelo de 6-OHDA unilateral.

Se aplicaron diversos protocolos de estimulación (corriente alterna, continua y mixta) y se comparó el poder de banda previo, durante y después de la estimulación. Los parámetros a usar se basaron en límites de seguridad, evitando el daño y dolor por parte del animal. Luego de la aplicación de dichos protocolos de estimulación y el análisis de sus resultados,

se determinó que el protocolo mixto, que usa corriente directa y alterna, de +2500 μ A / 300 Hz, fue el único efectivo en disminuir la actividad beta en el circuito motor durante y posterior a su aplicación, por lo tanto fue seleccionado para llevar a cabo el diseño experimental propuesto.

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar los efectos de la estimulación eléctrica no invasiva, se procedió a la clasificación de forma randomizada de dos grupos, a los que se denominó: (a) 6-OHDA con estimulación eléctrica no invasiva y (b) 6-OHDA sin estimulación eléctrica no invasiva (total = 6 ratas, cada grupo n= 3). (Tabla 1)

Grupo	Lesión 6-OHDA Unilateral	Estimulación eléctrica no invasiva	Test del Cilindro	Test del Rotámetro	Control de Peso
A	✓	✓	✓	✓	✓
B	✓	✗	✓	✓	✓

Tabla 1: **Resumen de tratamientos y medidas de control:** Se realizó el siguiente diseño experimental donde el grupo A será el grupo estimulación (n=3). y el grupo B, el control (n=3).

A partir del día 10, se inició el protocolo de estimulación eléctrica diariamente para el grupo A. Dicho protocolo se realizó en vigilia a través de electrodos. En la estimulación eléctrica no invasiva, dos electrodos de 2,5 x 1 cm se posicionaron en la zona dorsal de la

columna en forma paralela a nivel tóraco- lumbar (cátodos) y a nivel ventral por abdomen, se colocó un electrodo de la mismas dimensiones (ánodo). En el grupo B se realizó la instalación de los parches de estimulación, pero no se aplicó el protocolo de estimulación.

Figura 1

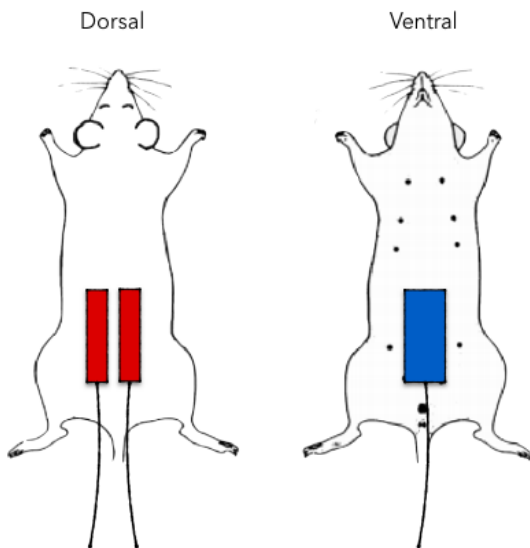


Figura 1 **Disposición de electrodos:** Dos ánodos en la zona dorsal con electrodos de 1,25 x 3 cms y un Cátodo en la zona ventral de 2,5 x 3 cms. Ubicados desde T12 a L5.

Las evaluaciones del control de peso se realizaron diariamente, al igual que el test del cilindro. El test rotacional, se llevó a cabo los días 12, 14, 16, 18 y 20 .

0,5 mm ventral a la superficie del cerebro con el diente-bar fijado en -3.0 mm, (3) -0,12 mm anterior al bregma, -0,45 mm lateral a la sutura sagital y -0,5 mm ventral a la superficie del cerebro con el diente-bar fijado en -3.0 mm, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson. La tasa de inyección fue de 1 µl/min. Después de cada inyección, la jeringa se dejó en su lugar durante cinco minutos antes de ser retirada lentamente (1 mm/min).

Tabla 2.

Inyección	AP	ML	DV
1era	+0,1	-0,3	-0,5
2da	-0,01	-0,37	-0,5
3era	-0,12	-0,45	-0,5

Tabla 2: Coordenadas de inyecciones para lesión 6-OHDA unilateral: Coordenadas según atlas de Paxinos y Watson para realizar lesión en proyecciones nigroestriales del hemisferio derecho de las ratas.

5.4 PRUEBAS MOTORAS

5.4.1 TEST DEL CILINDRO

La prueba del cilindro evalúa el grado de asimetría en el uso de las patas delanteras, ya que el hemicuerpo contralateral al hemisferio inyectado con 6-OHDA es el afectado en términos motores. Se realizó la prueba una semana antes de la lesión para tener un nivel basal; luego se evaluó a la semana siguiente para corroborar el efecto de la lesión con 6-OHDA. Finalmente, se evaluó en forma diaria, para conocer los efectos terapéuticos del tratamiento realizado.

Las ratas se colocaron en un cilindro transparente (20 cm de diámetro y 30 cm de altura) durante tres minutos, y se registró el número de contactos de las patas delanteras a la pared del cilindro[72].

La puntuación de la prueba del cilindro se calcula en relación a la pata contralateral de la lesión, es decir, $[(N^{\circ} \text{ contactos pata contralateral}) - (N^{\circ} \text{ contacto pata ipsilateral}) / (N^{\circ} \text{ contactos totales}) \times 100]$ [73].

5.4.2 TEST ROTACIONAL

La prueba del rotámetro[74] inducida por apomorfina (5.0 mg/kg, Sigma-Aldrich, USA) que provoca que la rata gire sobre su propio eje en sentido contralateral a la lesión, se evaluó cada dos días y se realizó posterior a la prueba del cilindro, para no influenciar el efecto farmacológico sobre dicho test. Los giros completados en 180° se evaluaron durante 30 minutos, lo que se registró a través de Software Rota-Count (Columbus Instruments, Ohio, USA).

5.5 CONTROL DE PESO CORPORAL

Se realizó un registro diario del peso corporal, para observar y comparar la recuperación de éste parámetro en ambos grupos, entre los días 0 y 21. Este registro se utilizó para conocer parte de la recuperación de la función motora y el aumento del apetito, asociado a la capacidad del animal para alimentarse y moverse.

5.6 INMUNOHISTOQUÍMICA

Después de la última sesión, el día 20 después de la inyección de 6-OHDA, Dos horas después de la inyección de Anfetamina, PTA (1,5 y 2,5 mg / kg ip respectivamente) o solución salina, las ratas fueron profundamente anestesiadas con hidrato de cloral (400 mg/kg, ip) y perfundidas transcardialmente con solución salina, seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5. Después de ello, se retiraron los cerebros, se cortaron en bloques y se mantuvieron en la solución de fijación de paraformaldehído durante 2 horas. Los bloques de tejido se transfirieron y se mantuvieron en 20% de sacarosa en solución salina tamponada con fosfato (PBS), durante 19 a 48 horas. Luego, los cerebros se seccionaron en cortes coronales 30- μ m por medio de un criostato Leica CM 1510 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemania).

- Detección inmunológica para TH: Los cortes cerebrales fueron incubados por 1 hora con solución de bloqueo, que contiene suero normal de cabra al 3% (Invitrogen), TritonTM X-100 al 0.4% y azida de sodio al 0.02% en PBS. Posteriormente, los cortes coronales fueron incubados durante toda la noche en la solución del anticuerpo primario anti-TH, hecho en conejo a una dilución 1/5000 (Cat N° 657012; Calbiochem). Al otro día, las secciones de cortes coronales se lavaron 4 veces con PBS, durante 10 minutos. Después de esto, se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA). La detección se realizó usando el kit Vectastain ABC (Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA) y lavados posteriormente con PBS (3 veces por 10 minutos). Luego, los cortes coronales fueron incubados con una solución de diaminobenzidina al 0.05% (Catálogo N°D-5905, Sigma-Aldrich), conteniendo

H₂O₂ al 0.025% en PBS como sustrato de reacción por 5-10 minutos, seguido de lavados con PBS (2 veces por 10 minutos). Finalmente, los cortes coronales fueron montados en porta objetos con gelatina al 0,1% , secados durante toda la noche y luego, cubiertos con cubreobjetos.

- **Análisis de datos:** El número de neuronas marcadas con TH se cuantificó en un área determinada en cada hemisferio, a nivel de la región evaluada. Las neuronas marcadas se contaron usando el programa Image J (NIH, EEUU). Los valores obtenidos de las neuronas marcadas en la sustancia nigra pars compacta (SNc) se resumieron en cada grupo. Se analizó el porcentaje del lado intacto y se utilizó el promedio para los análisis estadísticos.

5.7 CÁLCULO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media \pm SD. Se utilizó ANOVA con análisis post-hoc para analizar las diferencias entre los grupos. La prueba post hoc de Bonferroni se aplicó para que fuera significativa entre los grupos.

6 RESULTADOS

6.1 PRUEBAS MOTORAS

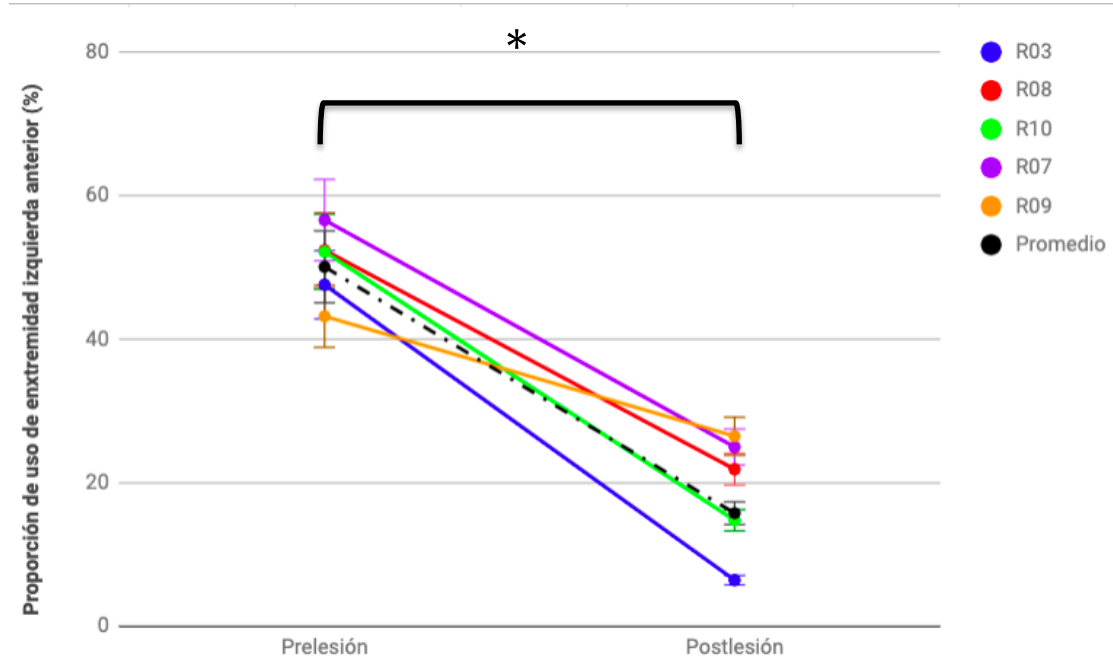
6.1.1 TEST DEL CILINDRO

Al analizar todas las ratas (n=6) que fueron lesionadas a nivel de estriado derecho y sus proyecciones con 6-OHDA, se logró corroborar la efectividad de éste procedimiento diez días después, a través del test del cilindro; evidenciándose un deterioro de la función motora (Pre-lesión: $50,07 \pm 4,65$ y Post-lesión: $15,77 \pm 10,71$, unidades porcentuales de uso de la extremidad anterior contralateral a la inyección de 6-OHDA, $p=0,015$, $n = 6$) (Figura 3A). Dicho test permite evaluar la asimetría del uso de las extremidades anteriores y es una medida sensible del grado de pérdida de neuronas dopaminérgicas del hemisferio lesionado.

Ambos grupos mostraron un rendimiento menor en la evaluación posterior a la cirugía, en Es importante mencionar que en los días posteriores a la medición post lesión no hubieron movimientos y/o contactos en varias de las medidas por parte de las ratas. Al ser una prueba de asimetría, no es posible realizar un análisis estadístico del desempeño motor de las ratas y del efecto de la estimulación eléctrica no invasiva. comparación con la evaluación basal (Figura 3B).

Figura 3.

(A)



(B)

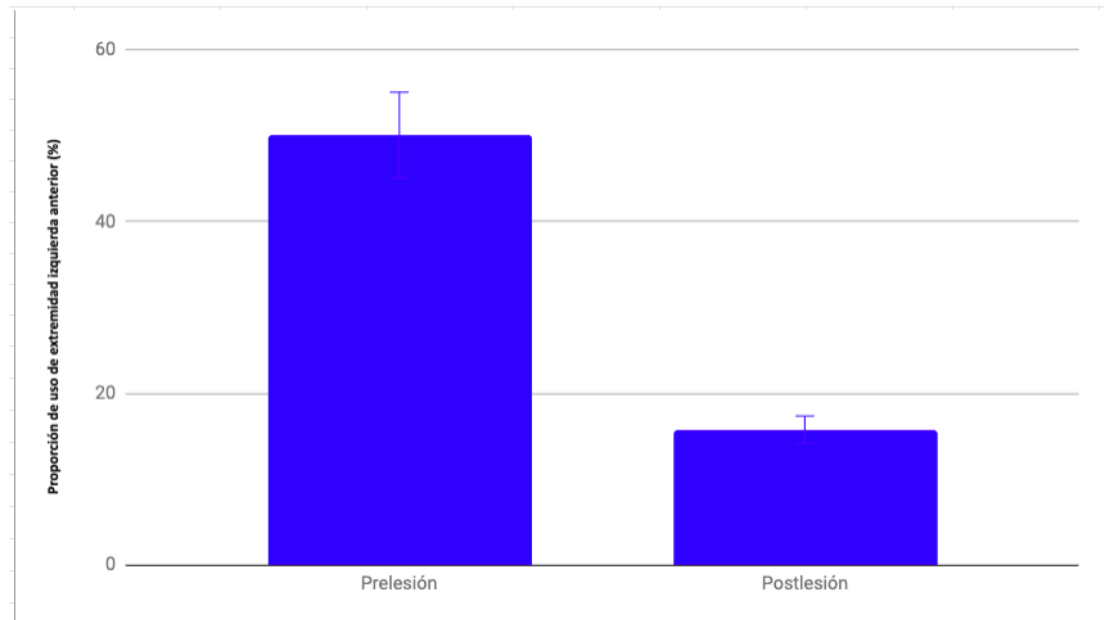


Figura 3. Resultados del test del cilindro. (A) Desempeño motor de cada rata. La puntuación de la prueba del cilindro se calcula en relación a la pata contralateral de la lesión, es decir, [(N° contactos pata contralateral)-(N° contacto pata ipsilateral)/(N° contactos totales) x 100]. (B) Promedio del desempeño motor de las 6 ratas mostrando una mayor asimetría en el contacto de las patas delanteras con el cilindro post-lesión (p=0.015, n=6).

6.1.2 TEST ROTACIONAL INDUCIDO POR APOMORFINA

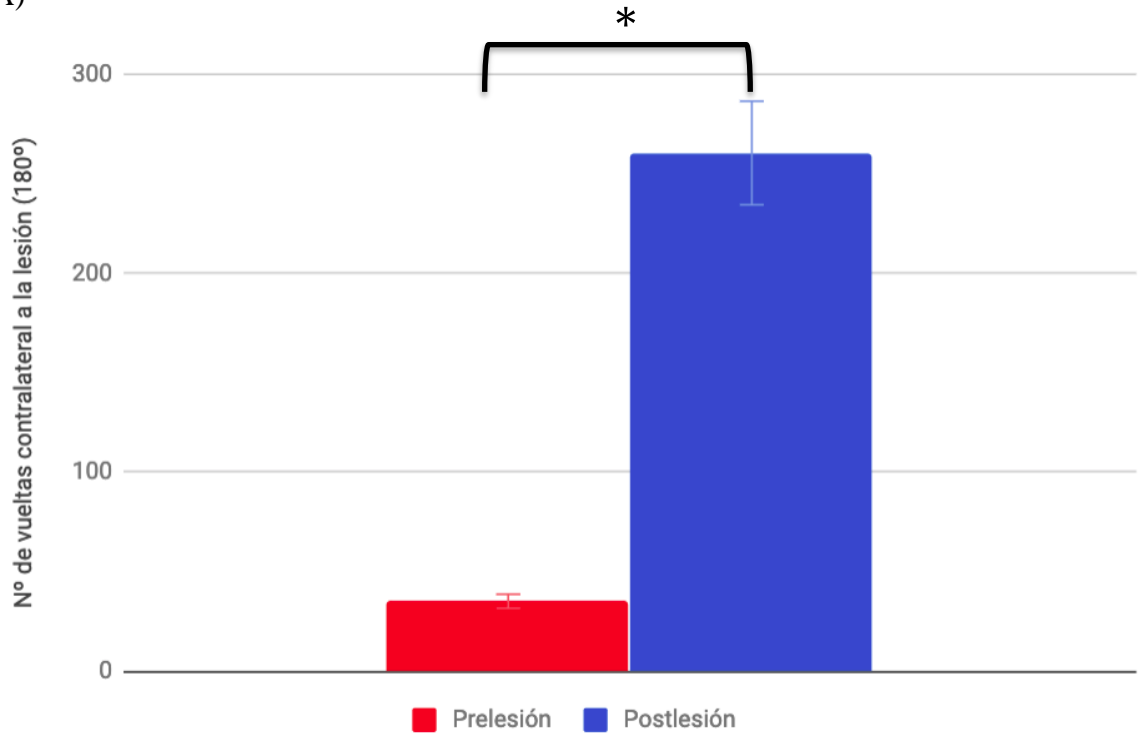
En el análisis de las rotaciones inducidas por apomorfina, se observa una diferencia entre el desempeño previo a cirugía y primera medida post cirugía (Prelesión: $35,17 \pm 7,17$ y Post-lesión N°1: $260,50 \pm 75,93$ vueltas en 180° en 30 minutos, p=0,48, n=6) que demuestra la efectividad de la lesión mediante esta prueba (Figura 4A).

Por otra parte, se observa una importante diferencia entre ambos grupos, A y B, existiendo un mejor desempeño motor en el grupo que recibió la estimulación.

El número de rotaciones inducidas ($180^\circ/30$ min.) por apomorfina, posterior a la estimulación eléctrica del grupo A (n=3), tiende a disminuir a contar del día 12: $133,33 \pm 83,18$, día 16: $514,33 \pm 210,44$, día 18: $309 \pm 155,56$, día 20: $388 \pm 57,36$). Esto, en comparación con el grupo B (n=3) (día 12: $369,33 \pm 103,22$, día 16: $574,66 \pm 164,83$, día 18: $636 \pm 317,21$, día 20: $765,33 \pm 340,37$). Se utiliza t-test para una muestra. No se observa una diferencia significativa entre ambos grupos p=0,55 en el día 20. (Figura 4B).

Figura 4

(A)



(B)

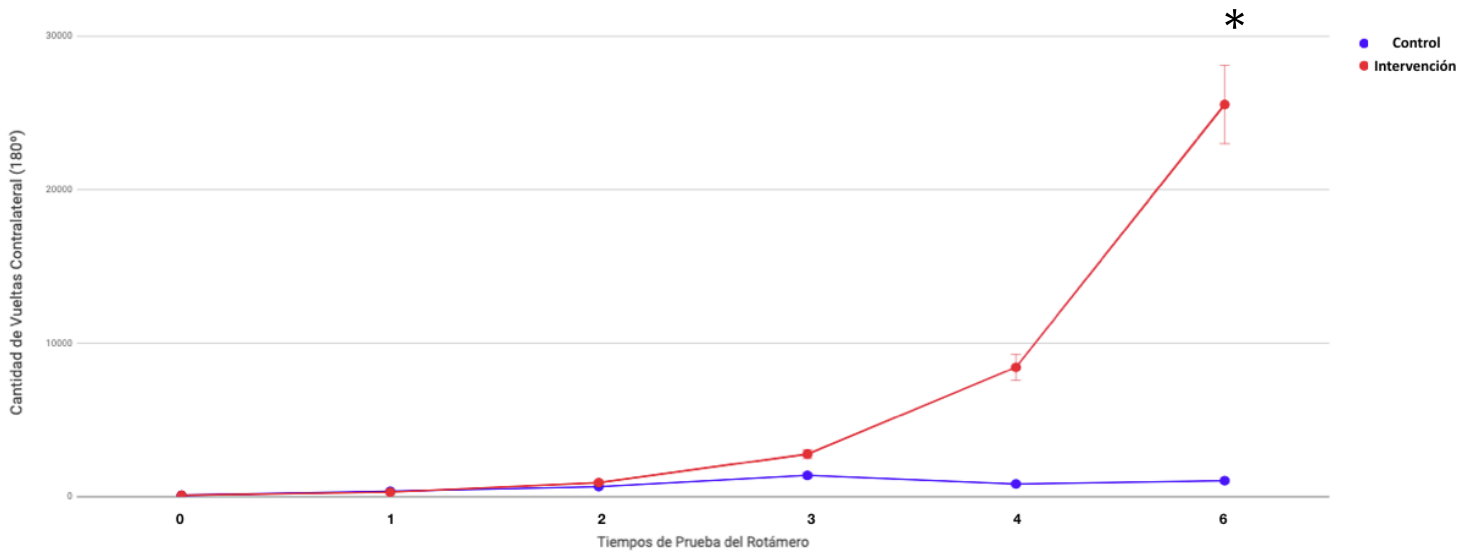


Figura 4: Número de rotaciones inducidas por apomorfina (180°/30 min.) (A) N° de vueltas contralateral a la lesión (180°) prelesión v/s postlesión n°1. Se observa una diferencia significativa en el desempeño motor del grupo de ratas prelesión v/s postlesión N°1 (n=6) (B) N° de vueltas contralateral a la lesión (180°). En el grupo de ratas estimuladas (verde) se observa una disminución de las rotaciones en comparación al grupo B (morado). La prueba del rotámetro inducida por apomorfina (5.0 mg/kg.) lo que provoca que la rata gire sobre su propio eje en sentido contralateral a la lesión, se evaluó cada dos días y se realizó posterior a la prueba del cilindro para no influenciar el efecto farmacológico sobre dicho test. Se miden la cantidad de vueltas (180° en 30 minutos).

6.2 CONTROL DE PESO CORPORAL

Previo a la cirugía, ambos grupos poseían un peso similar: grupo A (estimulación, n = 3)

(406,67 ± 27,53 gramos) y grupo B (control, n = 3) (411,33 ± 15,63 gramos) (Figura 5A).

Posterior a la cirugía, existió una pérdida de peso en ambos grupos, que luego fue

recuperada en los días siguientes. El registro de peso preoperatorio, también fue similar:

(427,67 ± 28,37 gramos) en el grupo A, mientras que en el grupo B fue de (409,33 ±

33,47 grs.). Al día 20, el peso de los grupos fue notoriamente distinto: grupo A (434,33 ±

53,29 gramos) y grupo B (388 ± 10,44 gramos). Se utilizó ANOVA con análisis post-hoc

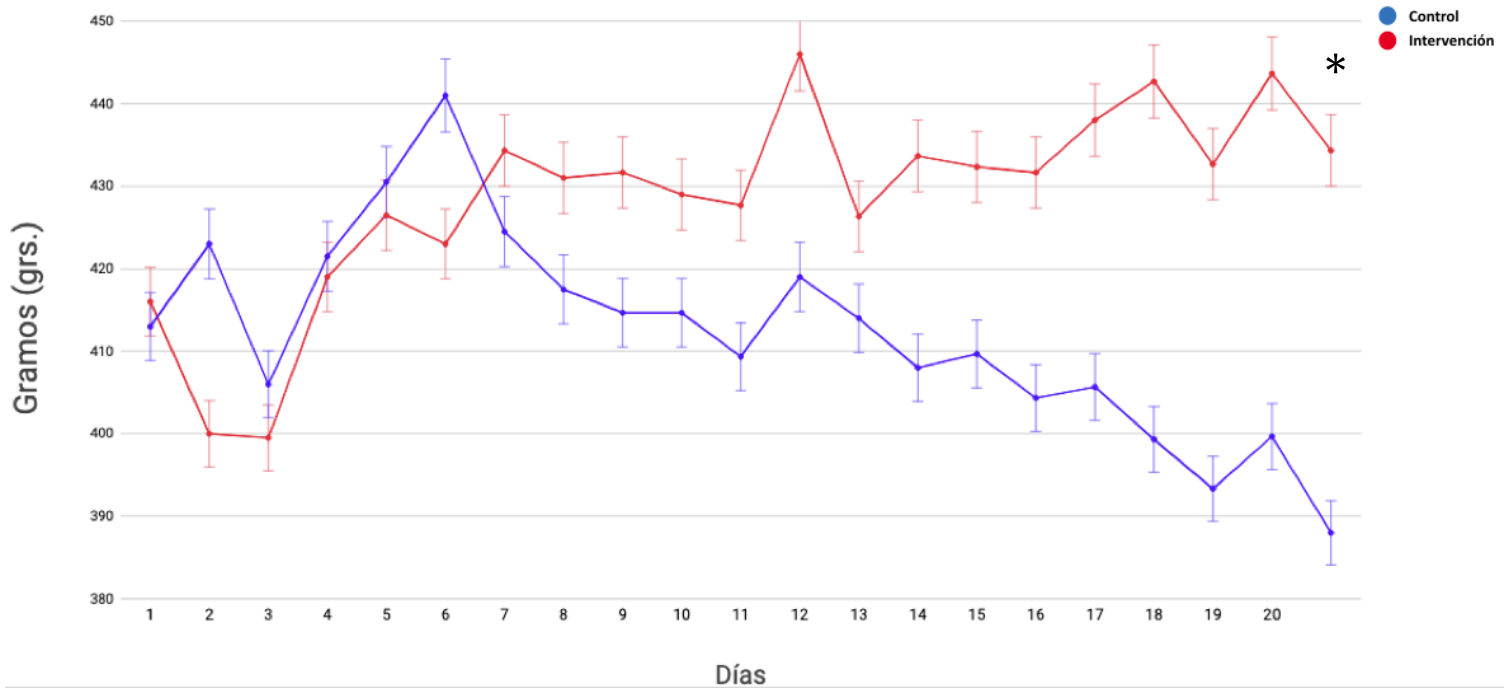
para analizar las diferencias entre los grupos. La prueba post hoc de Bonferroni se aplicó

para que fuera significativa entre los grupos. Existió diferencia significativa entre ambos

grupos en el último día: p= 0,034. (Figura 5B)

Figura 5.

(A)



(B)

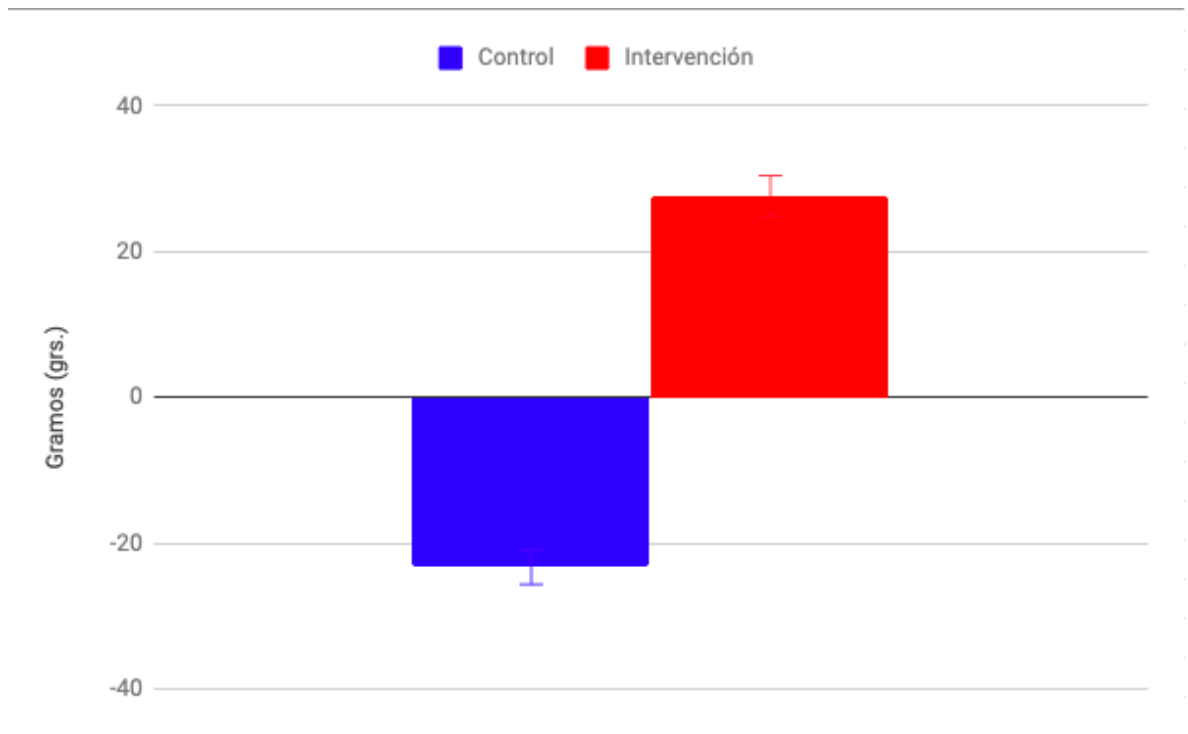


Figura 5: Evolución de Peso: (A) Promedio de peso de grupo control, n=3 (morado) v/s grupo estimulación n=3 (verde), se observa la evolución del día de cirugía (día 0), inicio de la estimulación (día 11) y evolución del peso hasta el día 20.

6.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Las ratas que recibieron estimulación (grupo A) mostraron una preservación significativa de las neuronas marcadas con TH en Sustancia Nigra Pars Compacta (SNpc) del hemisferio lesionado; siendo el promedio de neuronas marcadas en grupo A (n=3) ($56,26 \pm 4,44$) en comparación con el grupo B (n=3) ($33,78 \pm 2,69$) Se utiliza t-test para una muestra ($p = 0,012$) (Figura 6).

Figura 6.

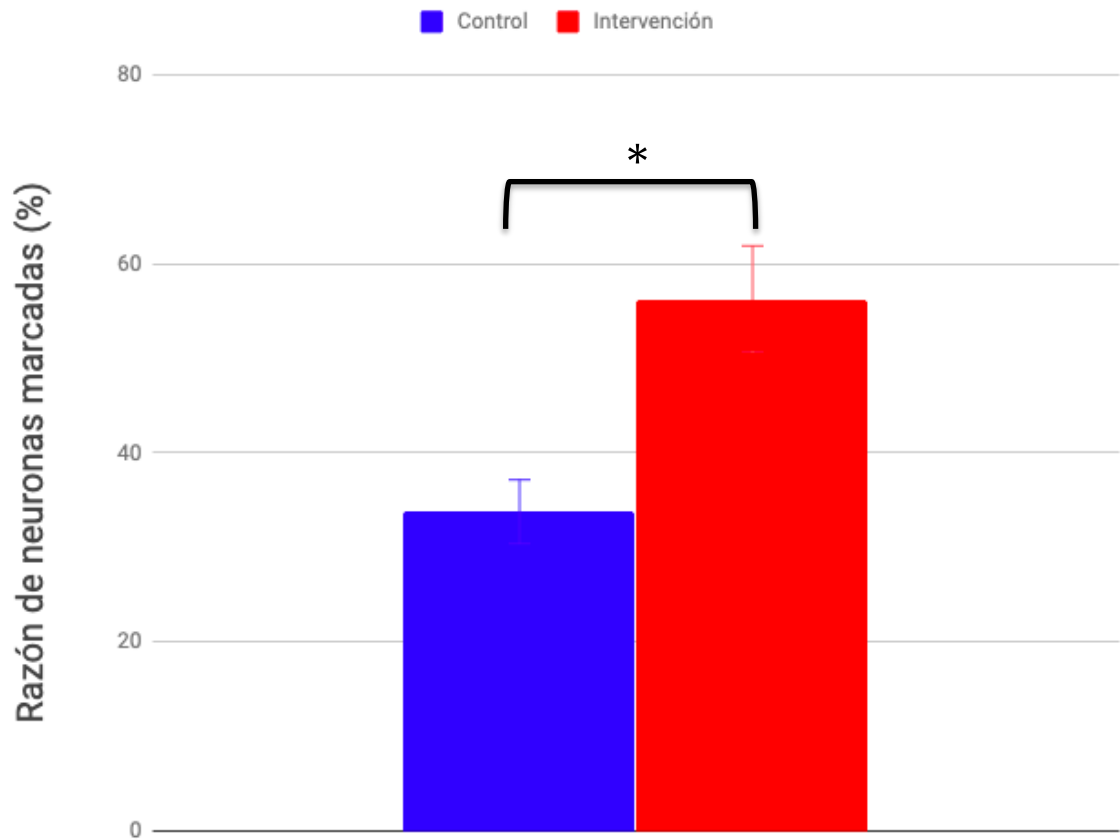


FIGURA 6: Neuronas marcadas con TH en Sustancia Nigra pars compacta (SNpc): Se observó una pérdida severa de las neuronas positivas para TH en SNpc en el grupo B (control), en cambio, se registra una mayor preservación de neuronas positivas para TH del hemisferio lesionado en SNpc en el grupo A (estimulación) (* $p = 0,012$, $n = 3$).

7 DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos de los experimentos podemos hallazgos interesantes. En primer lugar, la evaluación del test del cilindro, ya que se permitió corroborar la efectividad de la lesión unilateral de 6-OHDA, todas las ratas mostrar un deterioro de la función motora utilizando este test. Dicha prueba evalúa la asimetría del uso de las extremidades anterior y es una medida sensible del grado de pérdida unilateral de la expresión de dopamina.[76, 77]

Esto nos permitió ratificar la efectividad de la lesión realizada. Sin embargo, no se logra determinar la efectividad del tratamiento en los grupos, ya que en las medidas posterior de evaluación post-lesión las ratas no tocaron el cilindro y no entraron en contacto con las paredes, por lo que no es posible determinar conclusiones en dicha prueba. Se sugiere a futuro modificar el diseño y no realizar la prueba diariamente.

En relación al test rotacional inducido por apomorfina, se observa una mejorar en el rendimiento motor en el grupo estimulación, la prueba de inducción por apomorfina es una prueba ampliamente utilizado para conocer el nivel de activación y liberación de dopamina, en este caso, se evalúa la disminución por las características del modelo parkinsoniano. [78, 79] Este modelos ha sido utilizado para conocer el efecto terapéutico de sustancias que mejoran los signos motores en experimentos con ratas con 6-OHDA y los resultados de nuestros experimentos obtienen resultados interesantes que nos permitirían sugerir que la técnica estimulación eléctrica mejora el rendimiento motor al igual que otros tratamientos utilizados para esta labor [79, 80]. A lo largo del experimento, se observa como en el grupo control existe un aumento de las vueltas contralateral que, reportaría un aumento significativo en la degeneración de la estructura lesionada en consideración con el grupo

lesionado y estimulado que reporta un menor aumento a lo largo del tiempo. Estos resultados se pueden comparar con tratamientos similares y comprobados de neuromodulación, farmacológicos y nuevos métodos para el tratamiento de la EP [78, 81, 82] El mecanismo por el cual el protocolo de estimulación atenúa el comportamiento de la rotación e inhibe la supersensibilidad de la DA en la actualidad sigue sin estar claro. La evidencia convergente sugiere que la inhibición de la actividad de la monoaminoxidasa-B (MAO-B) podría atenuar la supersensibilidad de los receptores de DA en el estriado en el modelo animal 6-OHDA. De acuerdo con estos resultados, es necesario un estudio adicional para determinar el mecanismo de subyacencia mediante el cual el protocolo de estimulación haría disminuir los déficits motores en el modelo animal parkinsoniano [79]

La evaluación del peso de ambos grupos se observan una diferencia entre ambos grupos. Antes de la cirugía y previo al inicio del protocolo de estimulación se observa que ambos grupos poseen un peso similar y se comportan del mismo modo, existiendo una leve pérdida del peso post-cirugía que luego, en ambos grupos aumenta en forma proporcional. Sin embargo, entre ambos grupos en el último día del protocolo existe una diferencia significativa. La trayectoria general de aumento de peso en el presente estudio fue consistente con el estudio de Kretschmer et al. [83] Este es un reporte que se relaciona con una mejora del rendimiento motor [84, 85] y se relaciona con el repertorio motriz de las ratas quienes logran un mejor balance y estabilización del control del peso en comparación con el grupo control, que es mas sedentario. Esta prueba se ha utilizado como índice de mejoramiento del comportamiento y está relacionado con la posibilidad de tener un mejor repertorio motor utilizando ambas extremidades anteriores, mejor funcionamiento motor y

balance de consumo v/s gasto energético, teniendo en cuenta que ambos grupos tenían acceso a comida estándar del laboratorio ad libitum. [83, 86, 87]

Al finalizar el protocolo de estimulación, se realiza la perfusión de las ratas con lesión 6-OHDA y realización del recuento y análisis de la presencia de tirosina hidroxilasa (TH) para cada rata. El resultado de la inumoreactividad para TH reveló una pérdida significativa de las neuronas dopaminérgicas en el hemisferio lesionado y existiendo una diferencia de pérdida entre ambos grupos. Que podría describir un posible mecanismo de neuroprotección que disminuye el curso natural de la lesión a través de 6-OHDA, el cual se relacionaría con los resultados del test rotacional, ya que en ambas pruebas se observa un deterioro a lo largo del tiempo que se aminora por efecto del tratamiento. Esta prueba nos permite por una parte, corroborar la efectividad de la lesión y la zona afectada y en segundo lugar, la diferencia en el recuento de neuronas de neuronas entre ambos grupos demostrando que existe una mayor conservación de neuronas tincionadas en el grupo estimulación

Estos resultados no podría sugerir un efecto restaurador, sin embargo, si existiría un efecto neuroprotector [88]. Esto estaría dado como resultado de la disminución de la perdida progresiva que produce la tóxina sobre el tejido lesionado y se asociaría con la recuperación funcional y estructural en un modelo animal clásico de PD, lo que sugiere un papel potencial en la regulación de la progresión de la enfermedad en los seres humanos.

De acuerdo con estos resultados, es necesario un estudio adicional para determinar el mecanismo de subyacencia mediante el cual el protocolo de estimulación permitiría este proceso de neuroprotección, una alternativa sería el registro y análisis de factores neurotróficos que podría colaborar en la explicación de este proceso.

En general, el mecanismo detrás de este efecto podría explicarse, sería a través de la modulación de las fibras aferentes de la columna dorsal, y posiblemente la activación o la excitabilidad de cambio de la vía meniscal medial, provocando cambios en el circuito talámico-ganglios basales-cortical, que pueden ser rastreados en términos de la actividad neuronal de estas áreas como lo explica [81]. Además, los circuitos espinales locales podrían ser moduladas por el protocolo de estimulación, por lo tanto, facilitando la influencia de los sistemas de control descendente, la mejora general de la función de motor.

Actualmente, aún nos encontramos en una etapa de exploración de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EP, de este modo, se han buscado nuevos complementos a este tratamiento. Ante eso, se han desarrollado nuevas estrategias, específicamente, a través de técnicas de estimulación eléctrica sobre núcleos de la base – técnica conocida como DBS [45, 50]- la cual ha sido efectiva en los síntomas motores de la EP [41, 43-45, 49, 50, 76-82]. Sin embargo, a pesar de poseer resultados prometedores, es riesgosa, ya que posee una gran cantidad de complicaciones durante y post-cirugía. Además, los posibles candidatos a este procedimiento son muy escasos, y alcanzarían sólo el 1-4% de los pacientes que padecen EP, según los criterios de inclusión al DBS[11, 48].

A partir de este escenario, se ha buscado nuevos blancos para lograr beneficios en los síntomas motores, por lo que se ha llegado a una técnica –conocida como SCS-[53-59, 61]. Este procedimiento se ha probado en ratones, ratas y primates a través de modelos de EP[54-61]. A pesar de ser un blanco periférico, aún se considera una técnica invasiva, por lo tanto, sus riesgos limitan su uso clínico, además de no existir una explicación del fenómeno que permite una disminución de los síntomas motores. Unas de las explicaciones

podría estar planteado de acuerdo a la disrupción de la oscilación sincrónica en baja frecuencia [56]. Esta disrupción se correlaciona con una disminución en los síntomas motores propios de la EP.

A partir de la información recopilada sería posible determinar que este método podría provocar los cambios esperados a nivel cortical o de núcleos de la base, interrumpiendo la sincronización en baja frecuencia [83] realizando una neuromodulación a través de la médula espinal por medio de la corriente continua, teniendo como resultado una mejora en los síntomas como la acinesia [55, 56]. Esto se debiera lograr utilizando los parámetros adecuados en tipo e intensidad, para poder atravesar las barrera que proporciona la piel, tejido conectivo y hueso hasta llegar a los cordones dorsales que es el objetivo de estimulación para que pueda transmitir dicho patrón e interrumpir esta sincronía que promovería este estado de acinesia al momento de lograr efectos similares al SCS.

A través de un método no invasivo y seguro, se podría restaurar la capacidad de movilizarse en forma más adecuada, mejorando la calidad de vida, tanto del paciente como de su familia.

Por lo tanto, el presente estudio proporciona una base científica para respaldar el potencial de alivio sintomático y de protección neuronal del protocolo de estimulación en un modelo experimental de parkinsonismo.

Esta técnica sería un gran avance en el tratamiento terapéutico sobre esta población, ya que sería un técnica no invasiva, ambulatoria, de bajo costo (en comparación con procedimientos quirúrgicos), además de permitir una retroalimentación por parte de las personas que lo utilizan.

En relación a las proyecciones de los resultados obtenidos, estos nos permite suponer que técnica no invasiva posee un gran potencial terapéutico a nivel clínico, ya que se desarrolla una estrategia terapéutica no invasiva que puede mejorar los síntomas motores de la EP. Del mismo modo podría considerarse como una práctica clínica de bajo costo, replicable, accesible, bajo riesgo y efectivo.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Kulisevsky, J., y cols., [Advanced Parkinson's disease: clinical characteristics and treatment (part I)]. *Neurologia*, 2013. **28**(8): p. 503-21.
2. Kulisevsky, J., y cols., *Advanced Parkinson's disease: clinical characteristics and treatment. Part II*. *Neurologia*, 2013. **28**(9): p. 558-83.
3. Bartels, A.L. and K.L. Leenders, *Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology*. *Cortex*, 2009. **45**(8): p. 915-21.
4. Meireles, J. and J. Massano, *Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease: clinical features, diagnosis, and management*. *Front Neurol*, 2012. **3**: p. 88.
5. Lyons, K.E. and R. Pahwa, *The impact and management of nonmotor symptoms of Parkinson's disease*. *Am J Manag Care*, 2011. **17 Suppl 12**: p. S308-14.
6. Schrag, A. and J.M. Schott, *Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism*. *Lancet Neurol*, 2006. **5**(4): p. 355-63.
7. Fahn, S., *Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **991**: p. 1-14.
8. Chen, H., y cols., *Research on the premotor symptoms of Parkinson's disease: clinical and etiological implications*. *Environ Health Perspect*, 2013. **121**(11-12): p. 1245-52.
9. Lorraine V Kalia, A.E.L., *Parkinson's disease*. *Lancet Neurol*, 2015. **386**: p. 896-912.
10. Hughes, A.J., y cols., *Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1992. **55**(3): p. 181-4.
11. Obeso, J.A., y cols., *Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle*. *Nat Med*, 2010. **16**(6): p. 653-61.
12. Gallagher, D.A., A.J. Lees, and A. Schrag, *Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) part I as a screening and diagnostic instrument for apathy in*

- patients with Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord, 2008. 14(7): p. 586-7.*
13. Gallagher, D.A., y cols., *Validation of the MDS-UPDRS Part I for nonmotor symptoms in Parkinson's disease. Mov Disord, 2012. 27(1): p. 79-83.*
 14. Morales, I., y cols., *The degeneration of dopaminergic synapses in Parkinson's disease: A selective animal model. Behav Brain Res, 2015. 289: p. 19-28.*
 15. Gaugler, M.N., y cols., *Nigrostriatal overabundance of alpha-synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity. Acta Neuropathol, 2012. 123(5): p. 653-69.*
 16. Wichmann, T. and M.R. DeLong, *Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. Curr Opin Neurobiol, 1996. 6(6): p. 751-8.*
 17. DeLong, M.R. and T. Wichmann, *Basal Ganglia Circuits as Targets for Neuromodulation in Parkinson Disease. JAMA Neurol, 2015. 72(11): p. 1354-60.*
 18. Tanner, C.M., E. Melamed, and A.J. Lees, *Managing motor fluctuations, dyskinesias, and other adverse effects in Parkinson's disease. Neurology, 1994. 44(3 Suppl 1): p. S12-6.*
 19. Fearnley, J.M. and A.J. Lees, *Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. Brain, 1991. 114 (Pt 5): p. 2283-301.*
 20. Daniel, S.E. and A.J. Lees, *Parkinson's Disease Society Brain Bank, London: overview and research. J Neural Transm Suppl, 1993. 39: p. 165-72.*
 21. Wichmann, T. and M.R. DeLong, *Basal ganglia discharge abnormalities in Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl, 2006(70): p. 21-5.*
 22. DeLong, M. and T. Wichmann, *Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders. Clin EEG Neurosci, 2010. 41(2): p. 61-7.*
 23. DeLong, M. and T. Wichmann, *Update on models of basal ganglia function and dysfunction. Parkinsonism Relat Disord, 2009. 15 Suppl 3: p. S237-40.*
 24. Shulman, J.M., P.L. De Jager, and M.B. Feany, *Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. Annu Rev Pathol, 2011. 6: p. 193-222.*
 25. Mizutani, Y., y cols., *Pharmacokinetic model of oral levodopa and role of carbidopa in parkinsonian patients. Biol Pharm Bull, 1995. 18(12): p. 1729-37.*

26. Agid, Y., y cols., *Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: a consensus meeting*. *Mov Disord*, 1999. **14**(6): p. 911-3.
27. Dhall, R. and D.L. Kreitzman, *Advances in levodopa therapy for Parkinson disease: Review of RYTARY (carbidopa and levodopa) clinical efficacy and safety*. *Neurology*, 2016. **86**(14 Suppl 1): p. S13-24.
28. Kempster, P.A., y cols., *Patterns of levodopa response in Parkinson's disease: a clinico-pathological study*. *Brain*, 2007. **130**(Pt 8): p. 2123-8.
29. LeWitt, P.A. and S. Fahn, *Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward*. *Neurology*, 2016. **86**(14 Suppl 1): p. S3-S12.
30. McDermott, M.P., y cols., *Factors predictive of the need for levodopa therapy in early, untreated Parkinson's disease. The Parkinson Study Group*. *Arch Neurol*, 1995. **52**(6): p. 565-70.
31. Olanow, C.W., A. Lees, and J. Obeso, *Levodopa therapy for Parkinson's disease: challenges and future prospects*. *Mov Disord*, 2008. **23 Suppl 3**: p. S495-6.
32. Shaw, K.M., A.J. Lees, and G.M. Stern, *The impact of treatment with levodopa on Parkinson's disease*. *Q J Med*, 1980. **49**(195): p. 283-93.
33. Clarke, C.E., *Mortality from Parkinson's disease in England and Wales 1921-89*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1993. **56**(6): p. 690-3.
34. Nutt, J.G., W.R. Woodward, and J.L. Anderson, *The effect of carbidopa on the pharmacokinetics of intravenously administered levodopa: the mechanism of action in the treatment of parkinsonism*. *Ann Neurol*, 1985. **18**(5): p. 537-43.
35. Ahlskog, J.E. and M.D. Muenter, *Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature*. *Mov Disord*, 2001. **16**(3): p. 448-58.
36. Vijayakumar, D. and J. Jankovic, *Drug-Induced Dyskinesia, Part 1: Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesia*. *Drugs*, 2016. **76**(7): p. 759-77.
37. Obeso, J.A., y cols., *The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease*. *Neurology*, 2000. **55**(11 Suppl 4): p. S13-20; discussion S21-3.
38. Little, S. and P. Brown, *The functional role of beta oscillations in Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2014. **20 Suppl 1**: p. S44-8.

-

39. Wang, H.C., A.J. Lees, and P. Brown, *Impairment of EEG desynchronisation before and during movement and its relation to bradykinesia in Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999. **66**(4): p. 442-6.
40. Benabid, A.L., y cols., *Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2009. **8**(1): p. 67-81.
41. Fasano, A., y cols., *Axial disability and deep brain stimulation in patients with Parkinson disease*. Nat Rev Neurol, 2015. **11**(2): p. 98-110.
42. Oswal, A., y cols., *Deep brain stimulation modulates synchrony within spatially and spectrally distinct resting state networks in Parkinson's disease*. Brain, 2016.
43. Volkmann, J., *Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease*. J Clin Neurophysiol, 2004. **21**(1): p. 6-17.
44. Volkmann, J., *Deep brain stimulation for Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2007. **13 Suppl 3**: p. S462-5.
45. Montgomery, E.B., Jr. and J.T. Gale, *Mechanisms of action of deep brain stimulation(DBS)*. Neurosci Biobehav Rev, 2008. **32**(3): p. 388-407.
46. Benabid, A.L., S. Chabardes, and E. Seigneuret, *Deep-brain stimulation in Parkinson's disease: long-term efficacy and safety - What happened this year?* Curr Opin Neurol, 2005. **18**(6): p. 623-30.
47. Kaminer, J., P. Thakur, and C. Evinger, *Frequency matters: beta-band subthalamic nucleus deep-brain stimulation induces Parkinsonian-like blink abnormalities in normal rats*. Eur J Neurosci, 2014. **40**(8): p. 3237-42.
48. Beric, A., y cols., *Complications of deep brain stimulation surgery*. Stereotact Funct Neurosurg, 2001. **77**(1-4): p. 73-8.
49. Mogilner, A.Y. and A.R. Rezai, *Brain stimulation: history, current clinical application, and future prospects*. Acta Neurochir Suppl, 2003. **87**: p. 115-20.
50. Volkmann, J., E. Moro, and R. Pahwa, *Basic algorithms for the programming of deep brain stimulation in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2006. **21 Suppl 14**: p. S284-9.

51. Jitkritisadakul O, Bhidayasiri R, Kalia SK, Hodaie M, Lozano AM, Fasano A, Systematic review of hardware-related complications of deep brain stimulation: Do new indications pose an increased risk?, *Brain Stimulation* (2017), doi: 10.1016/j.brs.2017.07.003
52. Morgante, L., Morgante, F., Moro, E., Epifanio, A., Girlanda, P., Ragonese, P., ... Savettieri, G. (2007). How many parkinsonian patients are suitable candidates for deep brain stimulation of subthalamic nucleus? Results of a questionnaire. *Parkinsonism & Related Disorders*, 13(8), 528–531. doi:10.1016/j.parkreldis.2006.12.013
52. Barolat, G., *Epidural spinal cord stimulation: anatomical and electrical properties of the intraspinal structures relevant to spinal cord stimulation and clinical correlations*. *Neuromodulation*, 1998. **1**(2): p. 63-71.
53. Barolat, G., y cols., *Epidural spinal cord stimulation with a multiple electrode paddle lead is effective in treating intractable low back pain*. *Neuromodulation*, 2001. **4**(2): p. 59-66.
54. de Andrade, E.M., y cols., *Spinal cord stimulation for Parkinson's disease: a systematic review*. *Neurosurg Rev*, 2016. **39**(1): p. 27-35; discussion 35.
55. Fuentes, R., P. Petersson, and M.A. Nicolelis, *Restoration of locomotive function in Parkinson's disease by spinal cord stimulation: mechanistic approach*. *Eur J Neurosci*, 2010. **32**(7): p. 1100-8.
56. Fuentes, R., y cols., *Spinal cord stimulation restores locomotion in animal models of Parkinson's disease*. *Science*, 2009. **323**(5921): p. 1578-82.
57. Hassan, S., y cols., *A patient with Parkinson's disease benefits from spinal cord stimulation*. *J Clin Neurosci*, 2013. **20**(8): p. 1155-6.
58. Nicolelis, M.A., y cols., *Spinal cord stimulation failed to relieve akinesia or restore locomotion in Parkinson disease*. *Neurology*, 2010. **75**(16): p. 1484; author reply 1484-5.
59. Santana, M.B., y cols., *Spinal cord stimulation alleviates motor deficits in a primate model of Parkinson disease*. *Neuron*, 2014. **84**(4): p. 716-22.

60. Shinko, A., y cols., *Spinal cord stimulation exerts neuroprotective effects against experimental Parkinson's disease*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101468.
61. Yadav, A.P., y cols., *Chronic spinal cord electrical stimulation protects against 6-hydroxydopamine lesions*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 3839.
62. Brys, I., y cols., *Spinal cord stimulation improves forelimb use in an alpha-synuclein animal model of Parkinson's disease*. Int J Neurosci, 2016: p. 1-9.
63. Fenelon, G., y cols., *Spinal cord stimulation for chronic pain improved motor function in a patient with Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2012. **18**(2): p. 213-4.
64. Bocci, T., y cols., *Spinal Direct Current Stimulation Modulates Short Intracortical Inhibition*. Neuromodulation, 2015. **18**(8): p. 686-93.
65. Bocci, T., y cols., *An unexpected target of spinal direct current stimulation: Interhemispheric connectivity in humans*. J Neurosci Methods, 2015. **254**: p. 18-26.
66. Bocci, T., y cols., *Transcutaneous spinal direct current stimulation modulates human corticospinal system excitability*. J Neurophysiol, 2015. **114**(1): p. 440-6.
67. Cogiamanian, F., y cols., *Transcutaneous spinal direct current stimulation*. Front Psychiatry, 2012. **3**: p. 63.
68. Cogiamanian, F., y cols., *Effect of spinal transcutaneous direct current stimulation on somatosensory evoked potentials in humans*. Clin Neurophysiol, 2008. **119**(11): p. 2636-40.
69. Cogiamanian, F., y cols., *Transcutaneous spinal cord direct current stimulation inhibits the lower limb nociceptive flexion reflex in human beings*. Pain, 2011. **152**(2): p. 370-5.
70. Morgante, L., Morgante, F., Moro, E., Epifanio, A., Girlanda, P., Ragonese, P., ... Savettieri, G. (2007). How many parkinsonian patients are suitable candidates for deep brain stimulation of subthalamic nucleus? Results of a questionnaire. Parkinsonism & Related Disorders, 13(8), 528–531. doi:10.1016/j.parkreldis.2006.12.013
71. Tieu, K., *A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a009316.

72. Simola, N., M. Morelli, and A.R. Carta, *The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease*. Neurotox Res, 2007. **11**(3-4): p. 151-67.
73. Iancu, R., y cols., *Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice*. Behav Brain Res, 2005. **162**(1): p. 1-10.
74. Schallert, T., y cols., *CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury*. Neuropharmacology, 2000. **39**(5): p. 777-87.
75. Roof, R.L. and E.D. Hall, *Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone*. J Neurotrauma, 2000. **17**(5): p. 367-88.
76. Tronci, E., y cols., *Amphetamine-induced rotation and L-DOPA-induced dyskinesia in the rat 6-OHDA model: a correlation study*. Neurosci Res, 2012. **73**(2): p. 168-72.
77. Meredith, GE & Kang, UJ Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. Mov Disord 21, 1595–1606 (2006).
78. Decressac, M., Mattsson, B. & Bjorklund, A. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and alpha-synuclein rat models of Parkinson's disease. Exp Neurol 235, 306–315 (2012).
79. Quintero, J. E., Ai, Y., Andersen, A. H., Hardy, P., Grondin, R., Guduru, Z., ... Zhang, Z. (2019). Validations of apomorphine-induced BOLD activation correlations in hemiparkinsonian rhesus macaques. NeuroImage: Clinical, 22, 101724. doi:10.1016/j.nicl.2019.101724
80. Konieczny, J., Czarnecka, A., Lenda, T., Kamińska, K., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2017). The significance of rotational behavior and sensitivity of striatal dopamine receptors in hemiparkinsonian rats: A comparative study of lactacystin and 6-OHDA. Neuroscience, 340, 308–318. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.10.070

81. Li, M., Li, L., Wang, K., Su, W., Jia, J., & Wang, X. (2017). The effect of electroacupuncture on proteomic changes in the motor cortex of 6-OHDA Parkinsonian rats. *Brain Research*, 1673, 52–63. doi:10.1016/j.brainres.2017.07.027
82. Yadav, A. P., & Nicoletis, M. A. L. (2017). Electrical stimulation of the dorsal columns of the spinal cord for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 32(6), 820–832. doi:10.1002/mds.27033
83. Takahashi, H., Ishikawa, H., & Tanaka, A. (2017). Regenerative medicine for Parkinson's disease using differentiated nerve cells derived from human buccal fat pad stem cells. *Human Cell*, 30(2), 60–71. doi:10.1007/s13577-017-0160-3
84. Deuschl, G., y cols., *Deep-brain stimulation for Parkinson's disease*. *J Neurol*, 2002. **249 Suppl 3**: p. III/36-9.
85. Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Kruger N, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sciences* 2005;76(14):1553–73.
86. Aoi, M., Date, I., Tomita, S., & Ohmoto, T. (2000). The effect of intrastriatal single injection of GDNF on the nigrostriatal dopaminergic system in hemiparkinsonian rats: behavioral and histological studies using two different dosages. *Neuroscience Research*, 36(4), 319–325. doi:10.1016/s0168-0102(00)00097-3
87. Landers, M. R., Kinney, J. W., Allen, D. N., & van Breukelen, F. (2013). A comparison of voluntary and forced exercise in protecting against behavioral asymmetry in a juvenile hemiparkinsonian rat model. *Behavioural Brain Research*, 248, 121–128. doi:10.1016/j.bbr.2013.04.002
88. Hampshire, V. A., Davis, J. A., McNickle, C. A., Williams, L., & Eskildson, H. (2001). Retrospective comparison of rat recovery weights using inhalation and injectable anaesthetics, nutritional and fluid supplementation for right unilateral

neurosurgical lesioning. *Laboratory Animals*, 35(3), 223–229.
doi:10.1258/0023677011911660

89. Willis, G. L., & Freelance, C. B. (2017). *The effect of directed photic stimulation of the pineal on experimental Parkinson's disease*. *Physiology & Behavior*, 182, 1–9. doi:10.1016/j.physbeh.2017.09.014
90. Chen, H.-H., Chang, P.-C., Chen, C., & Chan, M.-H. (2018). Protective and therapeutic activity of honokiol in reversing motor deficits and neuronal degeneration in the mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacological Reports*, 70(4), 668–676. doi:10.1016/j.pharep.2018.01.003
91. Benabid, A.L., *Deep brain stimulation for Parkinson's disease*. *Curr Opin Neurobiol*, 2003. **13**(6): p. 696-706.
92. Volkmann, J., y cols., *Long-term effects of pallidal or subthalamic deep brain stimulation on quality of life in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2009. **24**(8): p. 1154-61.
93. Rosenow, J.M., y cols., *Deep brain stimulation for movement disorders*. *Neurol Res*, 2004. **26**(1): p. 9-20.
94. Mogilner, A.Y. and A.R. Rezaieh, *Brain stimulation: current clinical indications and future prospects*. *Suppl Clin Neurophysiol*, 2004. **57**: p. 721-32.
95. Machado, A., y cols., *Deep brain stimulation for Parkinson's disease: surgical technique and perioperative management*. *Mov Disord*, 2006. **21 Suppl 14**: p. S247-58.
96. Kumar, R., y cols., *Deep brain stimulation of the globus pallidus pars interna in advanced Parkinson's disease*. *Neurology*, 2000. **55**(12 Suppl 6): p. S34-9.
97. Fanselow, E.E., A.P. Reid, and M.A. Nicolelis, *Reduction of pentylentetrazole-induced seizure activity in awake rats by seizure-triggered trigeminal nerve stimulation*. *J Neurosci*, 2000. **20**(21): p. 8160-8.