



**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**ESTIMACIÓN DE LA LATENCIA DE LA RESPUESTA EVOCADA  
POR LA ESTIMULACIÓN MEDULAR EPIDURAL EN RATAS  
MODELADAS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**FABIOLA VILLALOBOS GONZÁLEZ**

**Tesis para optar al grado de  
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Director de Tesis: Andrés Chávez  
Codirector de Tesis: Rómulo Fuentes**

**2 0 2 0**

## **RESUMEN**

La estimulación medular epidural (EME) es una técnica ampliamente utilizada para el tratamiento del dolor crónico (Jensen & Brownstone, 2019; Jeon, 2012), que ha demostrado efectos en otras patologías, como es la enfermedad de Parkinson (EP) (Fuentes, 2009). Si bien su aplicación en la EP es reciente, dado sus prometedores resultados como una estrategia para el manejo de síntomas motores, y por plantearse como una alternativa complementaria al tratamiento farmacológico, o una opción menos invasiva para aquellos pacientes que no sean candidatos a la estimulación cerebral profunda (Morgante et al., 2007), es que se considera relevante profundizar el conocimiento respecto a los mecanismos que median su efecto.

Entre otros aspectos, a la fecha no existe mayor claridad sobre la secuencia temporal de transmisión del estímulo una vez que ha alcanzado las estructuras supraespinales, ni tampoco se conoce si el estado motor en que este se encuentre el sujeto (reposo o actividad) o si la presencia de EP respecto a un sujeto sano tendría influencia sobre cómo es procesada la entrada generada por la estimulación medular.

Para responder a estas preguntas se realizaron experimentos de pulsos únicos de EME en ratas modeladas con EP con registro simultáneo en estructuras claves del circuito, formado por la corteza, GB, y tálamo, y con dichos datos se construyó la respuesta evocada a EME. Si bien luego del análisis el número de muestra disminuyó considerablemente, dificultando la presentación de resultados concluyentes, se puede sugerir que el estado motor y la presencia / ausencia de EP, podrían modular la respuesta supraspinal a la EME, especialmente la amplitud de esta, y que el impulso se transmitiría con una secuencia desde núcleos talámicos a estructuras subcorticales y luego corteza.

## **ABSTRACT**

Spinal Cord Stimulation (SCS) is a widely used technique for the treatment of chronic pain (Jensen & Brownstone, 2019; Jeon, 2012), which has shown effects in other pathologies, such as Parkinson's disease (PD) (Fuentes, 2009). Although its application in PD is recent, given its promising results as a strategy for managing motor symptoms, and because it is considered as a complementary alternative to pharmacological treatment, or a less invasive option for those patients who are not candidates for Deep Brain Stimulation (Morgante et al., 2007), it is considered relevant to deepen the knowledge regarding the mechanisms that mediate its effect.

Among other aspects, to date there is no greater clarity on the temporal sequence of transmission of the stimulus once it has reached the supraspinal structures, nor is it known whether the motor state in which the subject is (rest or activity) or whether the presence of PD with respect to a healthy subject, would influence how the input generated by spinal stimulation is processed.

To answer these questions, single-pulse EME experiments were performed in rats modeled with PE with simultaneous registration in key structures of the circuit, formed by the cortex, GB, and thalamus, and with these data the evoked response to EME was constructed. Although after the analysis the sample number decreased considerably, making it difficult to present conclusive results, it can be suggested that the motor state and the presence / absence of PE could modulate the supraspinal response to EME, especially its amplitude, and that the impulse would be transmitted in sequence from thalamic nuclei to subcortical structures and then cortex.

## **Agradecimientos**

*En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor, Dr. Andrés Chávez y Co-tutor Dr. Rómulo Fuentes, quienes con sus conocimientos, dirección, apoyo y empatía a través de las diferentes etapas de este proyecto, me alentaron a llegar a la conclusión del mismo.*

*También quiero agradecer al Laboratorio de Control Motor y neuro modulación de la Universidad de Chile, por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación, así como a cada uno de los integrantes de éste, con quienes se generó un proceso colaborativo muy valioso, pudiendo aprender de cada uno de ellos. En particular a Carolina Astudillo, por su generosidad y colaboración con datos centrales para el desarrollo de esta tesis.*

*Por último, quiero agradecer a mi familia y amigos, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo.*

*Muchas gracias a todos.*

## **Contenidos**

### *1. Introducción, antecedentes*

### *2. Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson*

#### 2.1 Ganglios Basales

#### 2.2 Déficit dopaminérgico en el Circuito de los Ganglios Basales

#### 2.3 Alteración de la actividad oscilatoria en los Ganglios Basales

### *3. Tratamientos Para La Enfermedad De Parkinson*

#### 3.1 Tratamiento con L- Dopa

#### 3.2 Estimulación Cerebral Profunda

#### 3.3 Estimulación Medular Epidural

a. Vías de las columnas dorsales y transmisión de la información somatosensorial

b. Mecanismos de acción potenciales

### *4. Descripción de la problemática*

### *5. Hipótesis*

### *6. Objetivos*

#### 6.1 Objetivo General

#### 6.2 Objetivos específicos

### *7. Diseño de investigación y metodología*

#### 7.1 Animales y cirugía

#### 7.2 Estimulación y registro electrofisiológico

#### 7.3 Análisis de datos

### *8. Resultados*

9. *Discusión*

12. *Referencias bibliográficas*

13. *Material complementario*

## **1. INTRODUCCION, antecedentes**

La estimulación medular epidural (EME) ha sido utilizada por muchas décadas como una estrategia de neuromodulación invasiva para el tratamiento de pacientes con dolor crónico, refractario a otros tratamientos convencionales (Shealy, Taslitz et al., 1967(Jeon, 2012). Con el paso de los años, han sido exploradas nuevas aplicaciones, observándose su utilidad en el tratamiento de otras patologías, entre las que se encuentra la Enfermedad de Parkinson (EP) (Fuentes, 2009)

La EP es un trastorno neurodegenerativo , que si bien se puede presentar en diferentes etapas de la vida, es común que aparezca en adultos mayores, afectando aproximadamente del 1 a 2% de las personas mayores de 65 años, cifra que alcanza al 3%-5% en mayores de 85 años (Lewitt, 2008). Se caracteriza por la presencia de síntomas motores cardinales, tales como rigidez, hipocinesia, temblor en reposo e inestabilidad postural, no obstante, también estaría acompañado por otros síntomas motores, como alteración de la marcha y de balance, además de síntomas cognitivos y emocionales. Todos estos tendrían su origen en la alteración del funcionamiento del circuito de los Ganglios Basales (GB) (Kalia & Lang, 2015; McGregor & Nelson, 2019).

## **2. ENFERMEDAD DE PARKINSON, fisiopatología:**

### ***2.1 Ganglios basales***

Los GB son un conjunto interconectado de núcleos subcorticales, compuestos por el estriado (caudado y putamen), globo pálido (porción interna y externa) , núcleo subtalámico y sustancia nigra ( pars compacta y reticulada) (Lanciego J, Luquin N, 2012; McGregor & Nelson, 2019), los que forman circuitos funcionales vinculados principalmente al control

motor, pero también a procesos cognitivos y límbicos (Suzanne N. Haber, 2016; Herrero et al., 2002; Kalia & Lang, 2015).

El núcleo estriado es considerado la principal estructura de entrada de información a los GB, recibiendo aferencias provenientes de corteza, tálamo y sustancia negra, mientras que el Globo pálido interno (Gpi) y sustancia negra pars reticulada (SNr) serían núcleos de salida, transmitiendo información desde el estriado al tálamo; mientras la porción externa del globo pálido (Gpe), el núcleo subtalámico (SNT) y la sustancia nigra, pars compacta (SNc) se encontrarían entre estos núcleos de relevo (S. N. Haber, 2014; Lanciego J, Luquin N, 2012). La información se transmite a través de éstos núcleos por dos vías antagonistas, una directa conformada por proyecciones gabaérgicas monosinápticas entre el cuerpo estriado y GPI / SNr , que facilita el inicio o mantención del movimiento, y una vía indirecta, polisináptica , donde participa el GPe y STN, que prevendría el inicio del movimiento o haría a éste cesar una vez iniciado (Albin et al., 1989; Suzanne N. Haber, 2016; McGregor & Nelson, 2019). En condiciones normales, las neuronas de la SNc proporcionan niveles más o menos estables de dopamina al estriado modulando ambas vías, y así favoreciendo la activación de la vía directa, mientras deprime la indirecta, lo que resulta en un estado permisivo de movimiento. (Groenewegen, 2003; Lanciego J, Luquin N, 2012; Yelnik, 2008)

## ***2.2 Déficit dopaminérgico en el circuito de los Ganglios Basales***

En la EP la concentración de dopamina en el estriado se encuentra disminuida debido a la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, lo cual altera el equilibrio del circuito recién mencionado, produciendo hipoactividad de la vía directa e hiperactividad de la vía indirecta, resultando en una inhibición excesiva del tálamo y la corteza, y con ello una

disminución de la función motora, característica de la EP (Groenewegen, 2003; McGregor & Nelson, 2019)

### **2.3 Alteración de la actividad oscilatoria en Circuitos de los Ganglios Basales:**

En paralelo al deterioro de la función motora causada por la depleción dopaminérgica, se observan alteraciones en la actividad neuronal en núcleos de la base, corteza y el tálamo, caracterizado por un importante aumento de los niveles normales de oscilaciones beta y sincronización a través de los GB, lo cual tendría una relación directa con el nivel de severidad de los síntomas observados. (Fuentes et al., 2010; McGregor & Nelson, 2019; Santana et al., 2014a) De esta forma, el aumento de actividad en la banda beta y un deterioro de la capacidad para suprimir la sincronización, limitarían la actividad neuronal a un patrón inflexible, cuya consecuencia serían los síntomas motores observados en la EP (The et al., 2005) , fenómeno que se ha observado tanto en humanos, como en modelos animales de primates no humanos y ratas. (Yadav & Nicolelis, 2017)

Con relación a las estructuras cerebrales que presentan esta alteración en la actividad neuronal, estudios en animales modelados con EP muestran comprometidos al estriado dorsolateral (EDL) y corteza motora primaria (M1), observadas tanto a nivel de Potencial de campo local ( LFP) como en los patrones de activación individual de neuronas (Fuentes, 2009). Asimismo otros estudios, revelaron actividad neuronal anormal altamente sincronizada en banda beta dentro de múltiples estructuras del circuito tálamo-córtico-ganglio basal (M1, EDL, GPi, GPe, STN, VL y VPL) y acoplamiento funcional excesivo entre ellos (Santana et al., 2014a). También se han observado patrones oscilatorios similares

en pacientes con EP, obtenidos por medio de registros electrofisiológicos de implantes de electrodo de estimulación cerebral profunda (Weinberger et al., 2006).

### ***3. Tratamientos para la Enfermedad de Parkinson***

En base a las características fisiopatológicas comentadas previamente, es que se han desarrollado múltiples estrategias de tratamiento para la EP.

***3.1 Tratamiento con L- Dopa:*** El tratamiento de primera elección es el farmacológico, a través de la administración de un precursor de dopamina L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-dopa), el cual disminuye efectivamente los síntomas asociados a la EP, no obstante, los resultados de su uso a largo plazo tienen como inconveniente la disminución de su eficacia inicial, asociado a complicaciones de difícil tratamiento, como las fluctuaciones motoras y discinesia inducida por L-dopa (LID)(Ahlskog & Muentner, 2001)

***3.2 Estimulación cerebral profunda:*** Por lo anterior, es que estrategias terapéuticas adicionales se han convertido en un importante complemento a la terapia de reemplazo de dopamina para el tratamiento sintomático de EP. Entre ellas se encuentra la estimulación eléctrica crónica de estructuras subcorticales del cerebro, un procedimiento conocido como estimulación cerebral profunda (ECP), el cual consiste en la implantación de electrodos directamente en regiones del cerebro, con el objetivo de alterar la actividad local y su conectividad a través de la estimulación de alta frecuencia. (Aum & Tierney, 2018; Tinkhauser et al., 2017)

Este enfoque terapéutico también es muy eficaz en el alivio de los síntomas motores de la EP, permitiendo a su vez una reducción en la dosis de L-dopa. (Kogan et al., 2019) Sin embargo, debido a lo invasivo del procedimiento quirúrgico y su necesidad de tecnologías complejas y costosas, es que la proporción de pacientes que se pueden ver beneficiado de este tratamiento se ve reducida a sólo un 1,6 - 4,5% de ellos.(Morgante et al., 2007; Yadav & Nicolelis, 2017).

### ***3.3 Estimulación Medular Epidural para la Enfermedad de Parkinson***

Como se mencionó inicialmente, la EME es una estrategia terapéutica validada para el tratamiento de síndromes de dolor crónico, y además reduce los síntomas motores cardinales de la EP (de Andrade et al., 2016) junto con otros síntomas resistentes al tratamiento con L-Dopa y ECP, como son el trastorno de la marcha e inestabilidad postural, (Yadav & Nicolelis, 2017) lo cual es un hallazgo significativo, dado que propone una alternativa menos invasiva a la ECP.

En modelos animales de EP se ha demostrado que la EME en la vía de los cordones dorsales a nivel torácico alto (T1–T2) puede aliviar la acinesia y restaurar la locomoción, y que simultáneamente a la mejora del comportamiento motor, se modificarían los patrones de actividad en la corteza motora primaria y en el cuerpo estriado dorsolateral, acercándolo a un estado muy parecido al que se encuentra antes y durante la iniciación espontánea de la locomoción en los animales normales. (Fuentes, 2009; Santana et al., 2014b; Yadav et al., 2014)(Fuentes, 2009; Santana et al., 2014a)

***a. Vía de las columnas dorsales y transmisión de la información somatosensorial:***

La activación de la vía de las columnas dorsales- lemnisco medial (CDLM) ha reportado efectos terapéuticos en variadas modalidades de estimulación y patologías. Su activación de forma periférica por medio de estímulos mecánicos o eléctricos no invasivos, proponen un efecto positivo en habilidades motoras de personas con daño cerebral adquirido, en conjunto a la modulación de la excitabilidad cortical y corticoespinal (Charlton et al., 2003; Koesler et al., 2009; Kojima et al., 2019; Tu-Chan et al., 2017), consecuente con el efecto observado por EME para manejo del dolor (Jensen & Brownstone, 2019) y de los síntomas de la EP (Fuentes, 2009; Santana et al., 2014a).

Esta vía sensitiva involucra 3 neuronas. La neurona de primer orden se encuentra en el ganglio de raíz dorsal, donde recibe información desde la periferia y la trasmite a la ME, luego, en su mayoría se proyecta ascendente por ME sin hacer sinapsis, conformando en su trayecto al fascículo grácil o cuneiforme, hasta hacer sinapsis a nivel de bulbo raquídeo en sus núcleos respectivos, (neurona 2° orden). Desde acá emergen las fibras arqueadas internas, que a través del tegmento medular decusan contralateralmente y luego forman el lemnisco medial, el cual hace sinapsis en el tálamo, en particular, en el núcleo ventral posterolateral (VPL), donde se encuentran las neuronas de tercer orden de la vía. Finalmente, sus axones se proyectan hasta la corteza somatosensorial primaria (S1). (Al-Chalabi M, 2020). Es importante mencionar que estudios informan proyecciones desde S1 hasta la corteza motora primaria (M1)(Pavlidis et al., 1993), así como aferencias de los núcleos centro medial y parafascicular del tálamo hacia el cuerpo estriado (Herrero et al., 2002)

Al integrar esta vía a otras áreas y núcleos del circuito motor, podemos visualizar que a través del tálamo la información sensitiva modula la actividad de los ganglios de la base y así de la

corteza motora (Fig nº 1), siguiendo la organización anatómica de la vía CDLM y del circuito de los ganglios basales.

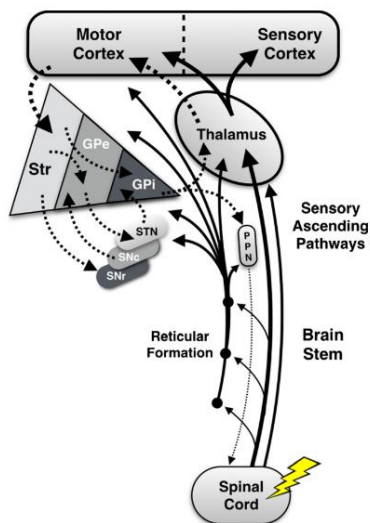


Fig nº 1: Esquema de las vías y estructuras relacionadas con el circuito motor de los Ganglios basales y su conexión con vías sensoriales ascendentes. A través de la EME y de la activación del tálamo se transmite la señal tanto a núcleos de la base, ( con entrada en estriado) como a la corteza somatosensorial y motora, modificando así la actividad cortical patológica en EP. Str: Estriado, GPe segmento externo de globo pálido, GPi segmento interno de globo pálido, STN núcleo subtalámico, SNc sustancia negra pars compacta, SNr sustancia negra pars reticulada, PPN núcleo pedunculopontino. (de Andrade et al., 2016)

## b. Mecanismos potenciales

La razón para usar la EME en tratamientos para el dolor fue inicialmente proporcionada por el efecto logrado al activar fibras de gran diámetro, mielinizadas, no nociceptivas de la columna dorsal de la médula espinal (Shealy, Taslitz et al., 1967). Posteriormente, se descubrieron otros mecanismos potenciales, entre los cuales está la parestesia desencadenada por la activación de los circuitos supraespinales producidos por la activación ortodrómica de las columnas dorsales (Jensen & Brownstone, 2019; Yadav & Nicoletis, 2017), efecto asociado al desarrollo y posterior aplicación de EME para EP.

Los mecanismos neurofisiológicos exactos involucrados en el alivio de los síntomas motores de EP no se han aclarado. Existen hipótesis mecanicistas que plantean una mejora en la marcha como resultado directo de la facilitación de circuitos espinales locales encargados del control muscular de las extremidades, y que por ello se corregirían elementos del

patrón de la marcha, como la velocidad y longitud de zancada. No obstante, aunque puede haber un componente local, hay efectos sobre síntomas como “la congelación de la marcha” (freezing of gait, FoG) el cual es conocido por asociarse a disfunciones del circuito cerebral, de modo que la EME tendría que generar algún efecto a nivel supramedular a través de las fibras ascendentes, para explicar dicho resultado.(Fonoff et al., 2019)

Investigaciones en humanos, con resonancia magnética funcional durante la aplicación de EME, revelaron una modulación clara de la actividad en estructuras corticales, tales como cortezas somatosensoriales primarias y secundarias (S1 y S2), corteza prefrontal, corteza cingulada, la ínsula y tálamo.(Cai et al., 2020) Asimismo, estudios de modelos computacionales y en modelos animales han demostrado que la EME, cuando se aplica dentro del rango terapéutico (por encima del umbral sensorial e inferior al de incomodidad), generalmente activa las fibras de las CD y las raíces dorsales en la vecindad del cátodo estimulante. Al estimular la aferente periférica somatosensorial se puede inducir una desincronización cortical potente, y así la activación sincrónica de alta frecuencia de las fibras CD conducirían a la desincronización cortico-estriatal, causando el alivio de síntomas de EP. (Fuentes, 2009; Santana et al., 2014a; Yadav & Nicoletis, 2017)

#### **4. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA**

Respecto los mecanismos sugeridos para explicar el efecto de la EME sobre los síntomas en la EP, se mantienen una serie de interrogantes que no permiten lograr un conocimiento total de los mecanismos involucrados, ni con ello certeza sobre sus efectos.

Entre estas, no hay claridad sobre la secuencia temporal y/o relevos en la transmisión del estímulo una vez que ha alcanzado las estructuras supra espinales. Tampoco existe claridad si el estímulo es transmitido de la misma manera cuando el sujeto se encuentra en estado

normal vs. Parkinsoniano, por ejemplo, un paciente con Parkinson antes y después de haber recibido levodopa. Tampoco se sabe si el estado motor del sujeto, vale decir, si está en movimiento o no, tendría influencia sobre cómo es procesada la entrada generada por la estimulación medular.

En cuanto al recorrido de la señal de la EME en el sistema nervioso, una alternativa es que el efecto de la EME sea la activación secuencial de distintas estructuras, y que siga el orden de las principales proyecciones entre una y otra. De esta manera, la secuencia de activación podría ser: columnas dorsales, vía lemniscal-medial, VPL, corteza somatosensorial primaria (S1), y finalmente estriado. Si esto fuera así, veríamos que la latencia de la respuesta evocada de la EME medida en VPL es consistentemente menor que la latencia medida en el estriado, y también en la corteza motora. Como hipótesis alternativa, se propone que la activación no es secuencial, y una vez que alcanza el VPL, posiblemente alcance otros núcleos talámicos, y por lo tanto la activación se propague en paralelo a distintas estructuras, por lo tanto, las latencias medidas serían de magnitudes comparables. El Pf es un núcleo talámico que proyecta al estriado, y su activación por EME indicaría que el VPL no es el único blanco talámico de EME, y podría explicar, por ejemplo, respuestas tempranas en el estriado sensoriomotor. En ese caso, en Pf debería observarse una menor latencia con respecto a STR, y su comparación con las latencias de VPL revelaría si se trata de una activación temprana, o una activación que proviene directamente desde VPL.

Finalmente, como se mencionó anteriormente, la respuesta del circuito neural motor a la EME puede estar modulada por el estado de éste: i) el estado motor del sujeto (movimiento vs. reposo) y el nivel de parkinsonismo (ejemplo: paciente con y sin levodopa).

Es por ello que en este trabajo se propone responder estas preguntas a través de experimentos de pulsos únicos de EME en ratas modeladas con EP con registro simultaneo en estructuras

claves del circuito formado por la corteza, GB, y tálamo. Los datos recolectados se usarán para construir la respuesta evocada a EME. La presencia de respuesta evocada permitirá inicialmente confirmar que los estímulos alcanzan las estructuras supra medulares del circuito (para efectos de esta investigación se considerarán estructuras en tres niveles: talámicas (VPL y Pf), ganglios de la base (Estriado) y corteza (M1)), y luego por medio de análisis de la latencia y amplitud de la respuesta evocada en distintas estructuras en diferentes condiciones experimentales (parkinsonismo -levodopa) y estados motores (activo- inactivo) se responderán las preguntas planteadas.

## **5. HIPÓTESIS**

1. La estimulación medular epidural modula la actividad en áreas supraespinales con una secuencia temporal definida, donde primero se activan núcleos talámicos y luego elementos corticales o de los núcleos de la base.
2. Esta modulación también se puede ver afectada por la condición motora (nivel de movimiento) o el estado (normal o parkinsoniano) del sujeto.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General**

Establecer la amplitud y latencia de la respuesta evocada a un pulso único de estimulación medular epidural en núcleos del circuito Cortico – Ganglio Basal, en ratas modelados con Enfermedad de Parkinson, durante reposo y actividad.

### **6.2 Objetivos específicos**

- Establecer mediante experimentos de pulsos únicos, la latencia y amplitud de la respuesta evocada a la estimulación medular epidural, en diferentes estados motores de animales modelados con EP.
- Establecer, mediante experimentos de pulsos únicos, la latencia y amplitud de la respuesta evocada a la estimulación medular epidural en estado Parkinsoniano y con Levodopa.
- Comparar la latencia del potencial evocado en respuesta a la estimulación medular epidural desde VPL hasta otros núcleos/ áreas del circuito motor (Pf, STR, M1)

- Comparar la latencia del potencial evocado en respuesta a la estimulación medular epidural desde Pf a STR.

## **7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y MÉTODOS**

**7.1 Animales y cirugías:** Se utilizaron datos provenientes de experimentos realizados por Carolina Astudillo<sup>1</sup>, obtenidos de un total de 4 ratas Sprague Dawley Machos, adultas. Cada una de ellas fue alojada en cajas individuales, en un ambiente de humedad y temperatura controlados, con ciclos de luz – oscuridad de 12 horas, y con acceso a comida y agua ad libitum. Todos los experimentos recibieron la aprobación ética de las autoridades designadas (Comité de Bioética sobre Investigación Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile).

**7.2 Modelo Animal de Enfermedad de Parkinson:** Se utilizó un modelo animal basado en la inyección de 6- hidroxidopamina (6 – OHDA). Esta es una toxina que no cruza la barrera hematoencefálica del cerebro, se inyecta en la SNpc , en el haz medial del cerebro anterior (MFB) o en el núcleo estriado, y produce una lesión masiva, prácticamente completa de cuerpos de las células dopaminérgicas en la sustancia nigra (Estelle et al., 2015; Shinko et al., 2014).

---

<sup>1</sup> *Kinesióloga, PhD(c) en Ciencias Biomédicas, integrante del Laboratorio de Control Motor y Neuromodulación..*

*A pesar de que los datos utilizados corresponden a C Astudillo, en el proceso de investigación realicé determinación de coordenadas y confección de electrodos de registro, de estimulación, cirugías de lesión, implante medular e implante de registro, en un total de 8 ratas*

### ***7.3. Diseño experimental***

***Electrodos:*** Se confeccionaron electrodos de estimulación y de registro, de acuerdo a protocolo de estudios anteriores (Fuentes, 2009).

Electrodos de estimulación: Conformados por dos placas de platino de 4x1 mm colocadas paralelas entre sí, con una separación de 1 mm o menos entre ellas. A cada placa se conectó con soldadura dos alambres delgados de acero inoxidable en la superficie superior. Luego fueron cubiertos con silicona quirúrgica, dejando la superficie inferior expuesta. Se aseguró una sutura quirúrgica entre las placas de platino, para posteriormente guiar el implante y fijar el electrodo a una vértebra, a fin de evitar la migración del electrodo.

Electrodos de registro: Se utilizaron electrodos de alambre de tungsteno con longitudes diferentes, correspondientes a las distancias de cada uno de los núcleos en estudio (VPL, Pf, STR, M1). Las coordenadas de las áreas de registro se determinaron en base a la 3° edición del Atlas Estereotáxico The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.). Los cables se conectaron a una placa de circuito unida a un conector de 32 canales (Omnetics Connector). Finalmente, todo el conjunto se fijó con resina de curado. Se elaboró un electrodo por hemisferio permitiendo la grabación de 64 canales

#### ***Procedimientos quirúrgicos:***

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron con animales bajo anestesia profunda, inducida en una cámara de isoflurano al 7%, y luego colocados en un marco estereotáxico con anestésico de mantención al 3%. Se utilizó lidocaína local en las zonas de incisión, y una vez finalizado el procedimiento se administraron antibióticos, analgésicos y dieta blanda.

***Cirugía de lesión con 6- ODHA:*** Para modelar la EP de acuerdo con el modelo mencionado, dos de los animales fueron sometidos a una craneotomía en las zonas correspondientes al

núcleo estriado, lugar donde utilizando una jeringa Hamilton, se administraron 3 series de 0.5 microlitros de 6-OHDA por minuto. Después de la inyección, la jeringa se mantiene en el lugar por 3 minutos adicionales, antes de retirar lentamente a una velocidad de 2 mm/min. Como resultado de la lesión, la rata R1 tuvo un 63,8% de pérdida dopaminérgica en hemisferio izquierdo, y 88% en hemisferio derecho. La rata R2 un 88,5% en hemisferio izquierdo, y 78,9% a derecha.

En las dos ratas restantes se repitió el mismo procedimiento, pero fueron tratadas con una inyección salina, a fin de poseer sujetos controles.

***Cirugía de estimulación Medular y de registro:*** De acuerdo a protocolos de estudios anteriores (Brys et al., 2017; Fuentes, 2009), se realizó un implante epidural de electrodos bipolares de estimulación, posicionados simétricamente sobre la línea media dorsal de la médula espinal en un nivel torácico alto (T3-T4). Las placas de electrodos quedan en contacto con la duramadre, y las estructuras de la médula espinal más cercanas a la superficie del electrodo son las columnas dorsales. Luego los cables de conexión se dirigen vía subcutánea en dirección cefálica hasta encontrarse con un conector ubicado en cráneo.

A su vez se realizó la implantación crónica de grupos de microelectrodos en ambos hemisferios para posterior registro de la actividad neuronal en LFP. Para ello se debió realizar craneotomía en las zonas de interés, configurar el estereotáxico de acuerdo con las coordenadas de los núcleos, y luego implantar bilateralmente los electros de registro, dirigidos a múltiples estructuras en cada animal, incluyendo: corteza motora primaria (MI), el núcleo talámico ventral posterolateral (VPL), núcleo parafascicular del tálamo (Pf) y núcleo estriado (STR).

**7.2 Estimulación y registro electrofisiológico:** Los registros se realizaron en un campo abierto, y los animales se sometieron a sesiones de estimulación de pulso único. Antes de cada sesión se determinó la intensidad de corriente de estimulación para cada rata. Se definieron dos estados motores: Activo, en movimiento e inactivo durante su reposo. En animales controles la estimulación fue aplicada durante 60 min en estado activo e inactivo, y a los animales parkinsonianos durante 120 min. Estos recibieron una inyección de Levodopa durante el registro, de modo que se logra registrar al sujeto parkinsoniano y luego con la condición revertida por medio de la administración de l-dopa.

### **7.3 Análisis de datos:**

**Adquisición de señal:** Las grabaciones electrofisiológicas se realizaron con un sistema de evaluación de amplificador de la serie RHD2000 (Intan Technologies, LLC, California) y el software Open Ephys GUI. Para obtener los LFP, las señales de los canales sin filtrar (en referencia a tres tornillos craneales conectados eléctricamente ubicados en el hueso occipital y frontal) se digitalizaron a 30 kHz y se guardaron. Luego los datos se extrajeron utilizando un código personalizado para Python. (Fig 2a) Los archivos fuentes fueron filtrados y se redujo su tasa de muestreo de 30 kHz a 1 kHz para lograr tamaños de datos compatibles con la capacidad computacional disponible.

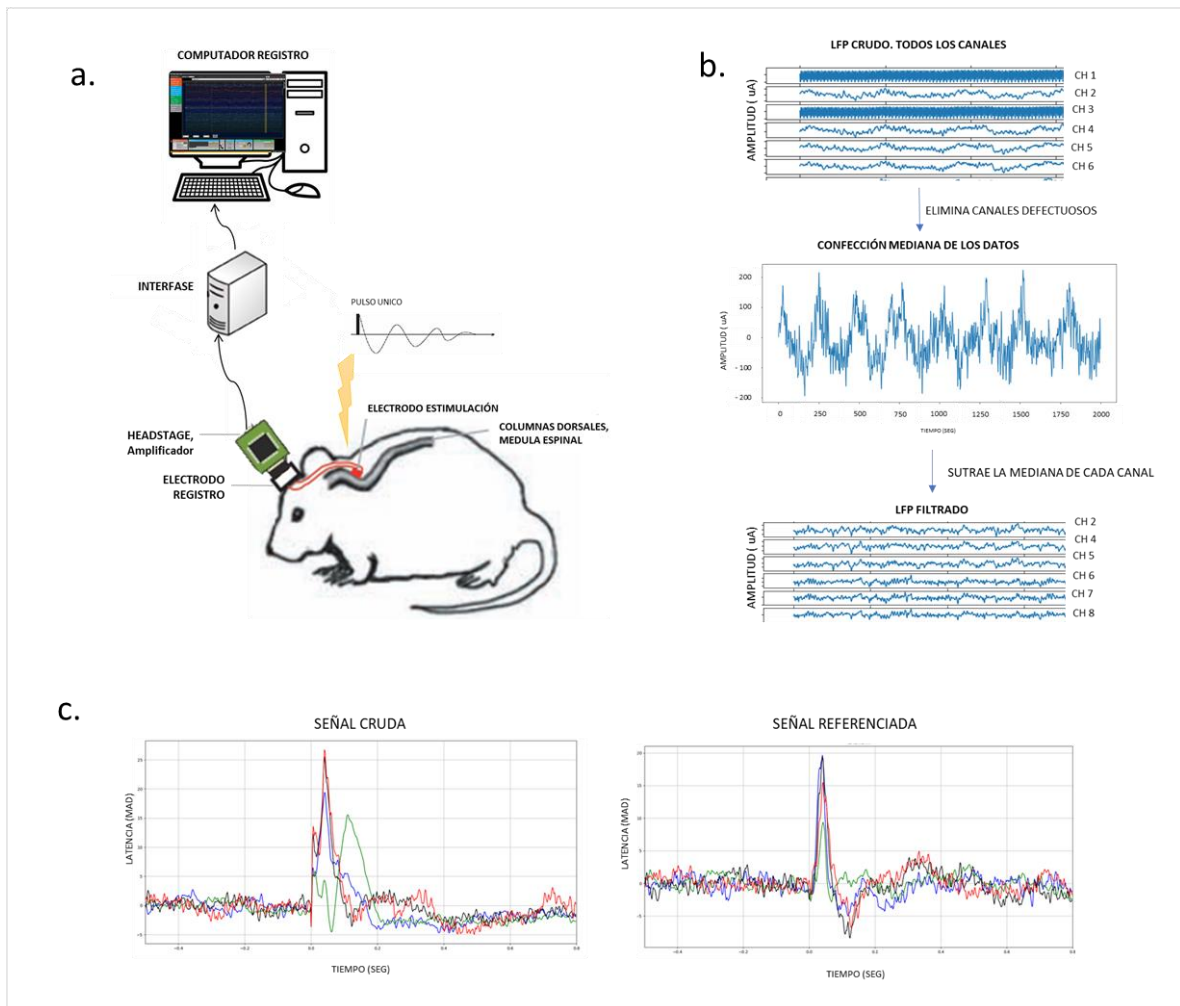


Fig 2: a. Esquema de proceso de adquisición de la señal desde el registro intracortical en ratas estimuladas con pulso único por medio de EME. Se utiliza un amplificador (headstage) que luego transmite la señal a una interfase y finalmente un computador (Open Ephys), donde se puede visualizar el registro. Posteriormente se realizó el análisis utilizando Python. Adaptado de (Fuentes, 2009). b. Parte del procesamiento de la señal, para la construcción de potenciales evocados. c. Comparación ejemplificadora del potencial construido con la señal no re-referenciada v/s re-referenciada.

Procesamiento de los datos: Inicialmente se hizo un preprocesamiento, donde se eliminaron los canales con errores en la grabación o que diferían de forma patente del comportamiento de otros canales. Luego se referenció la señal a la mediana de todos los canales con lo que se logra atenuar artefactos (Fig 2c), y posteriormente se calculó un z-score robusto (se restó a cada muestra la mediana de todo el canal y luego se dividió por la desviación absoluta de la mediana) ( Fig 2b) A continuación se obtuvieron las marcas de tiempo (Times stamps) de

los pulsos desde un archivo análogo digital por canal que almacenó la estimulación. Se identificaron los Time Stamps correspondientes a cada estado motor/condición experimental y para cada grupo se construyeron los potenciales evocados promediando la señal de LFP alrededor de los Time Stamps (Fig. 3a). Por cada canal de registro se obtuvieron dos potenciales evocados para ratas controles (inactivo y activo) y cuatro para ratas parkinsonianas (inactivo parkinsoniano, inactiva levodopa, activo parkinsoniano, activo levodopa) (Fig. 3 b y c). Para determinar la latencia y la amplitud de la respuesta evocada, se identificó el primer peak con amplitud positiva o negativa sobre 5 desviaciones absolutas medias (DAM) (límite de significancia definido a priori), siendo la latencia el tiempo (milisegundos, ms) desde el pulso (tiempo=0) hasta el peak, mientras que la amplitud corresponde al módulo del valor del peak en el eje y (Fig. 3).

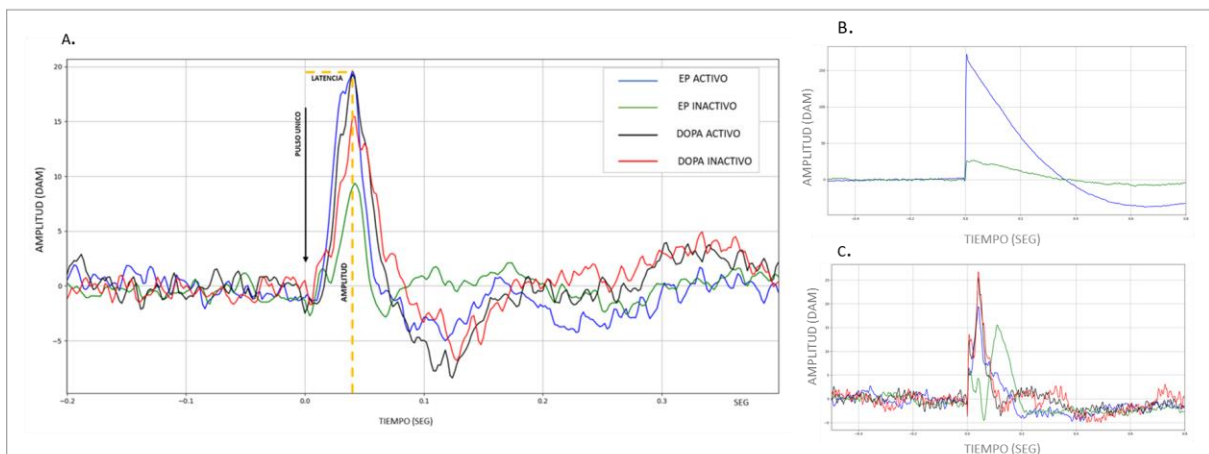


Fig. 3: Gráficas de la señal. A. Esquema de una respuesta tipo, donde se visualiza potencial conformado por cuatro épocas y modo de estimación de latencia y amplitud (primer peak sobre 5 DAM). b y c, Ejemplos de graficas obtenidas para animal control (b) y experimental (c)

Los análisis estadísticos posteriores se realizaron con Microsoft Excel y su complemento Real Statistics. De acuerdo con el resultado de la prueba Shapiro Wilk, los datos obtenidos no presentan distribución normal, así como tampoco estaban balanceados por grupo. Por lo tanto, se descartó el uso de ANOVA de dos vías y en su lugar se usaron pruebas no paramétricas para realizar comparaciones dirigidas. Las latencias y amplitudes de potenciales evocados en distintas condiciones motoras (reposo v/s movimiento en animales Parkinsonianos y DOPA) o experimental (Parkinsoniano v/s DOPA durante el movimiento y el reposo), se consideraron medidas repetidas o dependientes (en el mismo canal se midieron las distintas condiciones), por lo tanto, para su comparación se utilizó la prueba de Wilcoxon. Para comparar las latencias de potenciales evocados entre núcleos (VPL- Pf- STR-M1), éstas se consideraron medidas independientes (distintos canales), por lo tanto, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para medidas independientes. Todos los análisis se aplicaron con 95% de confianza y alfa de 0.05 de significancia, usando el método de Bonferroni que corrige el valor de alfa de acuerdo con el número de comparaciones realizadas.

## **8. RESULTADOS**

En ambas ratas parkinsonianas se logró extraer y procesar el LFP por cada uno de los canales. A continuación, promediando la actividad en torno a 250 pulsos únicos por condición, se construyeron los potenciales o respuestas evocadas correspondientes para cada canal, recordando que cada canal está en un núcleo definido. Las respuestas evocadas sobre 5 desviaciones absolutas de la mediana fueron consideradas significativas. La presencia de estas respuestas, de gran amplitud, sugiere que los pulsos de la EME están efectivamente modulando la actividad en los núcleos estudiados (Fig. 3a).

Si bien se realizó el proceso de adquisición de señal y el análisis de ésta para 4 animales, se consideraron los resultados de solo dos de ellos. Esto debido a que los registros de los animales controles, tanto por la morfología, como latencia y amplitud máxima al primer pico, indicarían no tener relación con el objetivo de esta investigación. Como se observa en la Fig. 3b, impresiona que el trazo corresponde a características físicas del estímulo (conducción volumétrica de la corriente) y no a una respuesta neurofisiológica. Por lo anterior, los datos de las dos ratas controles fueron descartados y se analizaron los datos de ambas parkinsonianas.

#### *Efecto del estado motor y condición experimental en la respuesta evocada en rata R1*

Al comparar las latencias en las 4 combinaciones de estado y condición experimental (inactivo Parkinsoniano, activo Parkinsoniano, inactivo-levodopa, activo-levodopa) en la rata R1 no se observaron diferencias significativas (test de Wilcoxon,  $p > 0.0083$ , que corresponde a un  $p = 0,05$  corregido por 6 comparaciones, Tabla Suplementaria 1).

Al comparar la amplitud de la respuesta evocada, se observaron diferencias marginalmente significativas sólo en el estriado entre el estado inactivo-parkinsoniano y activo-parkinsoniano ( $p = 0.0085$ , test de Wilcoxon, Tabla Suplementaria 2). Fig. 4a.

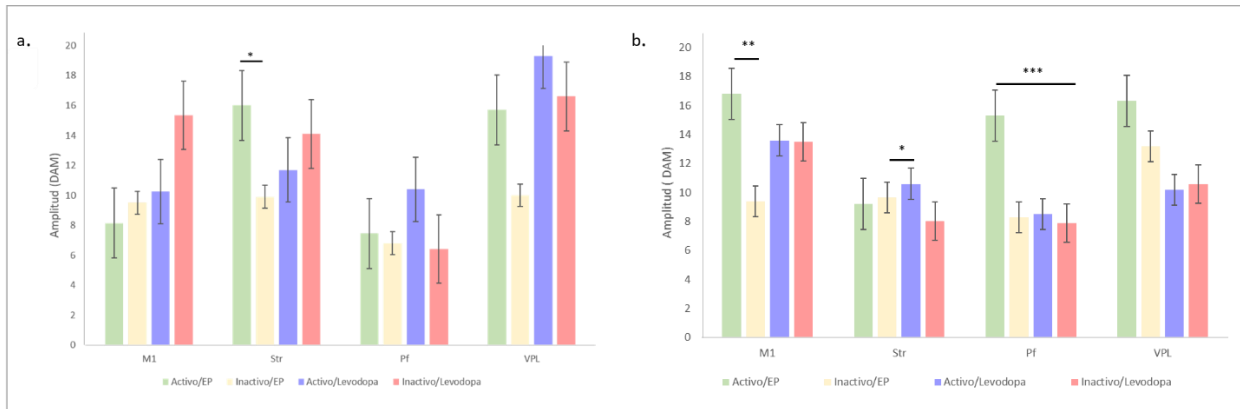


Fig. 4: Comparación de amplitud de la respuesta a la EME por núcleo (M1, Str, Pf, VPL) y estado motor o experimental, para rata R1 (a.) y rata R2 (b). Amplitud representada por la mediana  $\pm$  desviaciones absolutas de la mediana (DAM).

### Efecto del estado motor y condición experimental en la respuesta evocada rata R2

En la rata R2 se observan diferencias en las latencias entre los estados inactivo y activo, en M1, Str y Pf. En M1 y Str la latencia es mayor en estado inactivo-parkinsoniano. En Pf ocurre lo opuesto (Fig. 5. b), donde hay mayor latencia en estado activo-parkinsoniano (Tabla 1).

AREA	ESTADO 1	LATENCIA (ms)	ESTADO 2	LATENCIA (ms)	P VALUE
<b>Pf</b>	Inactivo/EP	42	Activo/EP	44	0.0017
	Inactivo/EP	46	Activo/ Levodopa	42	0.0039
<b>M1</b>	Inactivo/EP	60	Inactivo/Levodopa	42	0.0078
	Inactivo/EP	60	Activo/ EP	36	0.0078
	Inactivo/EP	60	Activo / Levodopa	40	0.0039

Tabla 1: Comparación de latencias en la rata R2 de acuerdo con estado motor/condición experimental por cada núcleo. Test de Wilcoxon con corrección de Bonferroni  $p= 0.0083$ .

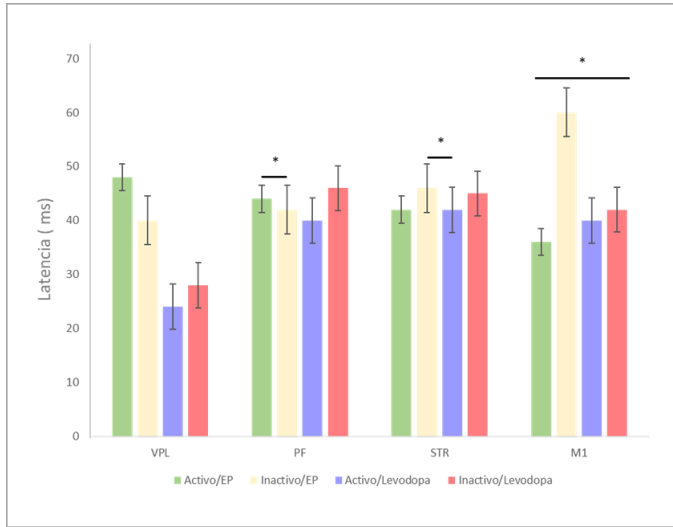


Fig. 5: Comparación de latencia por área y estados en rata R2. Se representa la mediana  $\pm$  DAM de la latencia.

En cuanto a la amplitud de la respuesta evocada en la rata R2, tanto el Pf, STR como M1, presentan diferencias significativas (d.s.) en Pf y M1, el estado activo parkinsoniano presenta mayor amplitud que los inactivos, ya sea parkinsoniano o con levodopa. (Fig. 4b, Tabla 2).

ÁREA	ESTADO	AMPLITUD	ESTADO	AMPLITUD	P VALUE
Pf	Activo/EP	15.3	Inactivo/EP	8.3	3.0518E-05
	Activo/EP	15.3	Inactivo/Levodopa	7.9	3.0518E-05
	Activo/EP	15.3	Activo/Levodopa	8.5	6.1035E-05
STR	Inactivo/EP	9.7	Activo/Levodopa	10.6	0.00390625
M1	Inactivo/EP	9.4	Activo/EP	16.8	0.0039

Tabla 2: Comparación de amplitud de la respuesta evocada en la rata R2 de acuerdo con el estado motor/experimental por núcleo. Alfa 0.05, corregido por 6 comparaciones  $p=0.0083$ . Amplitud expresada en unidades de puntaje Z robusto.

Estos resultados, principalmente los obtenidos en la rata R2, sugieren que el estado motor y la condición parkinsoniana si modula la respuesta supraespinal a la EME, especialmente la amplitud de ésta.

### Comparación de latencias entre estructuras

Para evaluar si las distintas estructuras presentan distintas latencias, lo cual podría indicar una secuencia de activación causada por la EME, se procedió a comparar las latencias en las áreas de estudio en cada rata por separado. Dado que la rata R1 no presentó diferencias en la latencia por estado/condición, se procedió a agrupar las latencias por estructura, obviando el estado/condición al cual pertenecen. Esta comparación arrojó que el Pf presenta la menor latencia (22 ms), seguido por VPL (26 ms) y luego STR y M1 (32 ms cada uno). (Fig. 6).

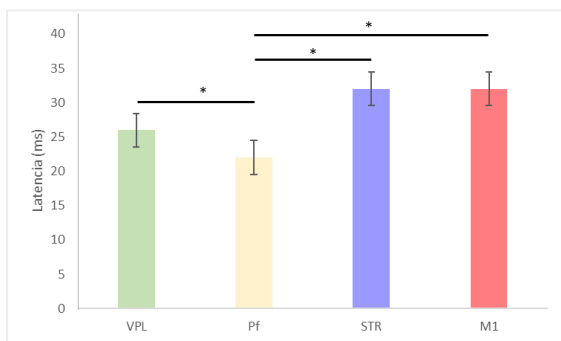


Figura 6: Grafica y tabla (2) de resultado de comparación de latencias entre distintos núcleos de rata R1 (test de Mann Whitney). Se representa la mediana  $\pm$  DAM de la latencia.

AREA	LATENCIA (ms)	AREA	LATENCIA (ms)	P VALUE
VPL	26	Pf	22	3.8608734E-06
Pf	22	STR	32	2.8552882E-05
Pf	22	M1	32	0.006

La comparación de latencias entre estructuras en la rata R2 se realizó por separado para cada estado/condición, ya que en esta rata se observaron diferencias significativas en las latencias durante el estado activo de Pf, VPL y M1, cuando estaban en estado parkinsonianas o con levodopa (Tabla 3). En la condición parkinsoniana la menor latencia se presenta en M1 (36ms), seguido de Pf (44ms) y VPL (48 ms), mientras que al administrarse levodopa la menor latencia la presenta VPL (24), seguido de Pf (40)y M1 (41).

ESTADOS	AREA	LATENCIA (ms)	AREA	LATENCIA (ms)	P VALUE
Activo/EP	VPL	48	Pf	44	0.008
Activo/EP	Pf	44	M1	36	0.0014
Activo/Levodopa	VPL	24	Pf	40	0.0002
Activo/Levodopa	VPL	24	M1	41	0.0019

Tabla 3: Comparación de latencias por núcleos, de acuerdo con estado motor/condición experimental, Rata R2 (Mann Whitney Test)

Se destaca que las latencias de VPL y Pf durante la actividad, al pasar de un estado parkinsoniano a levodopa disminuye considerablemente (VPL EP = 48ms v/s VPL Levodopa= 24 ms; Pf EP = 44ms v/s Pf Levodopa = 40 ms) (Fig. 7).

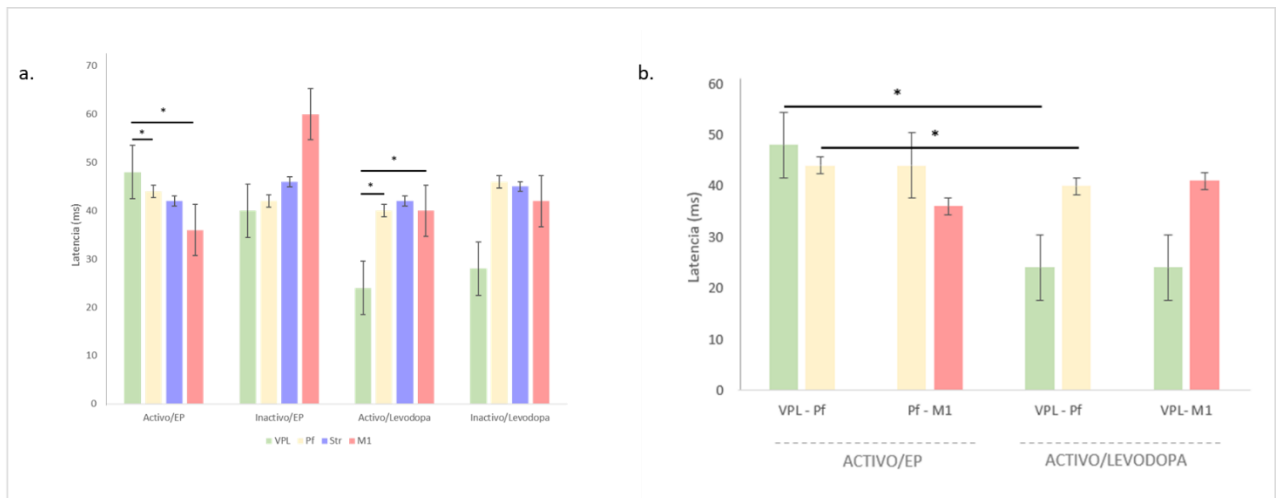


Fig. 7: Comparación de latencias por núcleos, de acuerdo con estado motor/condición experimental. (a.) Comparación de todos los núcleos y estados, (b.) Comparación de latencias antes y después de la administración de Levodopa en la Rata R2, en núcleos con diferencias significativas. Mann Whitney Test. Se representa la mediana  $\pm$  DAM de la latencia

### Resumen de los resultados obtenidos por pruebas no-paramétricas

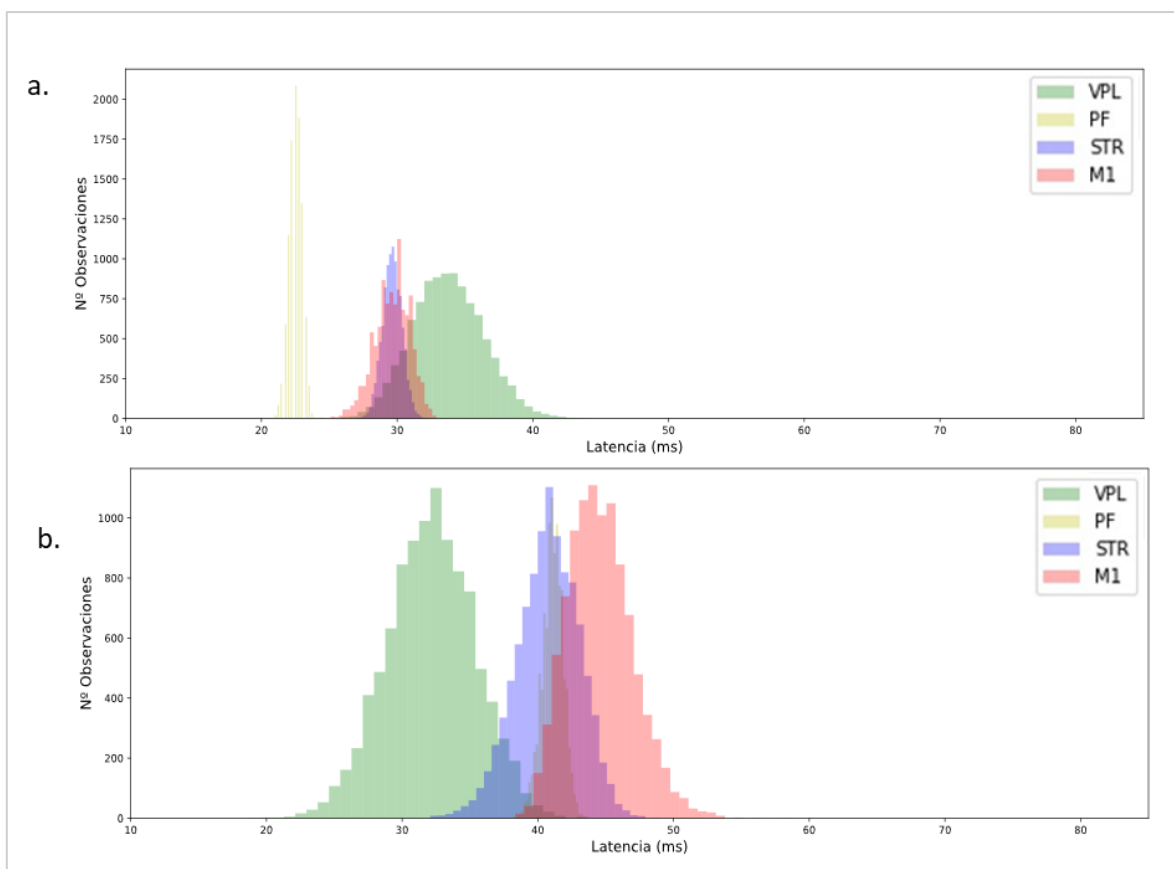
En los resultados de la rata R1 se observan latencias más tempranas en Pf y VPL, y valores de latencias similares entre STR y M1, sugiere que la estimulación medular epidural se transmite desde las columnas dorsales vía lemniscos mediales hasta los núcleos talámicos. A partir del tálamo se distribuiría por distintas vías alcanzando el STR y la corteza. En esta rata no se observó que el estado motor o la condición parkinsoniana afectasen las latencias.

Por el contrario, los resultados en la rata R2 sugieren que el estado y condición si afecta las latencias, incluso alterando la secuencia hipotética de activación de las distintas áreas. En el estado activo Parkinsoniano la EME activaría primero M1, luego PF y VPL, y cuando se administra levodopa, el orden de activación sería VPL- Pf y luego M1. Asimismo, se observó que el estímulo tardaría menos en llegar a núcleos talámicos, cuando el sistema dispone de dopamina.

### Análisis por estimación de latencia promedio basado en bootstrapping

Considerando resultados disimiles entre las 2 ratas el análisis de latencias se complementó con una estrategia de re-muestreo, el *bootstrapping*. Para ello cada conjunto de muestras fue re-muestrada con reemplazo y obtenido un promedio del re-muestreo. Este proceso se realizó 10,000 veces, obteniéndose así, para cada conjunto de muestras, una distribución de los promedios probables si hubiéramos repetido este experimento 10,000 veces. Esto se realizó tanto para datos agrupados, como para datos diferenciados por estados/condiciones en cada una de las ratas. Luego se graficó la distribución de los promedios de la latencia por cada estructura o estado/condición. Esto permite una estimación

de la posición de los promedios y el rango en pueden variar. De esta manera se puede estimar, en una sola figura, que latencias son distintas de otras, y cuál es la secuencia de ellas.



*Fig. 8: Comparación de latencias por núcleos, distribución de los promedios de latencias por estructura obtenidos por bootstrapping. a. Rata R1, latencias promedio: 22.5 ms Pf, 29.6 ms Str, 29.6 ms M1, y 33.7 ms VPL. b. Rata R2: 32.1 ms VPL, 40.7 ms Str, 41.1 ms Pf, 44.6 ms M1.*

En la Fig. 8 se pueden visualizar las latencias (todos los estados/condiciones agrupados) por estructura. En la rata R1 alcanzaría tempranamente a Pf, luego se transmitiría simultáneamente a STR y M1, para finalmente llegar a VPL (Fig. 8a). Este orden es compatible con los resultados de las pruebas no-paramétricas, excepto en VPL, que aparece

junto a Pf, mientras que aquí es el más tardío en cuanto a latencia. En la rata R2 se logra visualizar la activación temprana en VPL, claramente distinta de los tiempos de activación de STR, Pf y M1, que por sus distribuciones que se superponen, podemos considerar que tienen iguales latencias.

La Fig. 9 muestra un análisis similar al anterior en la rata R1, sólo que esta vez se separó por estado motor y condición. A pesar de la aplicación de *bootstrapping*, no se observan distribuciones simétricas (excepto en STR, que presentaba el mayor número de canales), seguramente debido al bajo número de canales en esta rata (un canal=una muestra), como se aprecia en Pf. Asimismo, se observa que las distribuciones de latencias promedio de distintos estados están superpuestas, confirmando así los resultados del análisis estadístico no-paramétrico que indica que el estado motor y la condición no afectan las latencias. (Fig. 9)

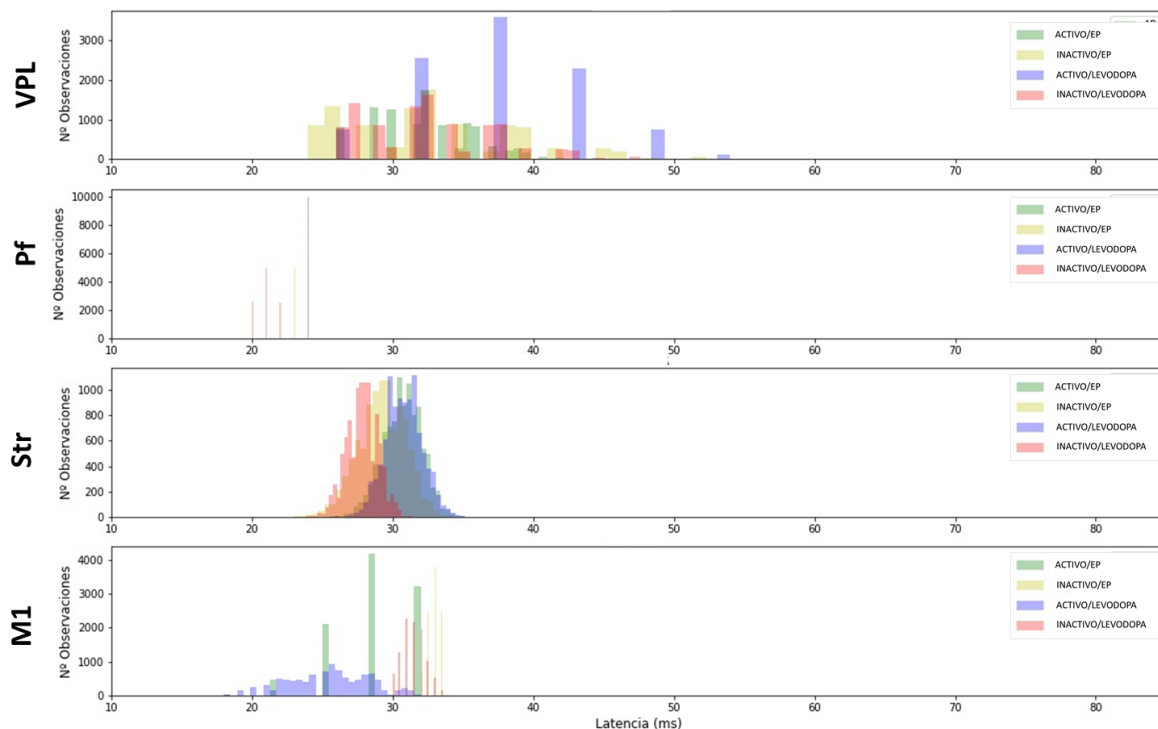


Fig. 9: Comparación de latencias por núcleos y estados utilizando el método *Boostrapping*. Rata R1

En cambio, la gráfica obtenida para la rata R2 (Fig. 10) confirma diferencias en las latencias por estado motor y condición parkinsoniana. En el VPL el estado activo parkinsoniano aumenta las latencias, mientras que en Pf no parecen haber cambios (todas las distribuciones están superpuestas). En el estriado se observa mayores latencias durante los estados parkinsonianos (activo e inactivo), y en M1 es evidente un notorio aumento de la latencia en estado inactivo parkinsoniano en relación con el resto. (Fig. 10)

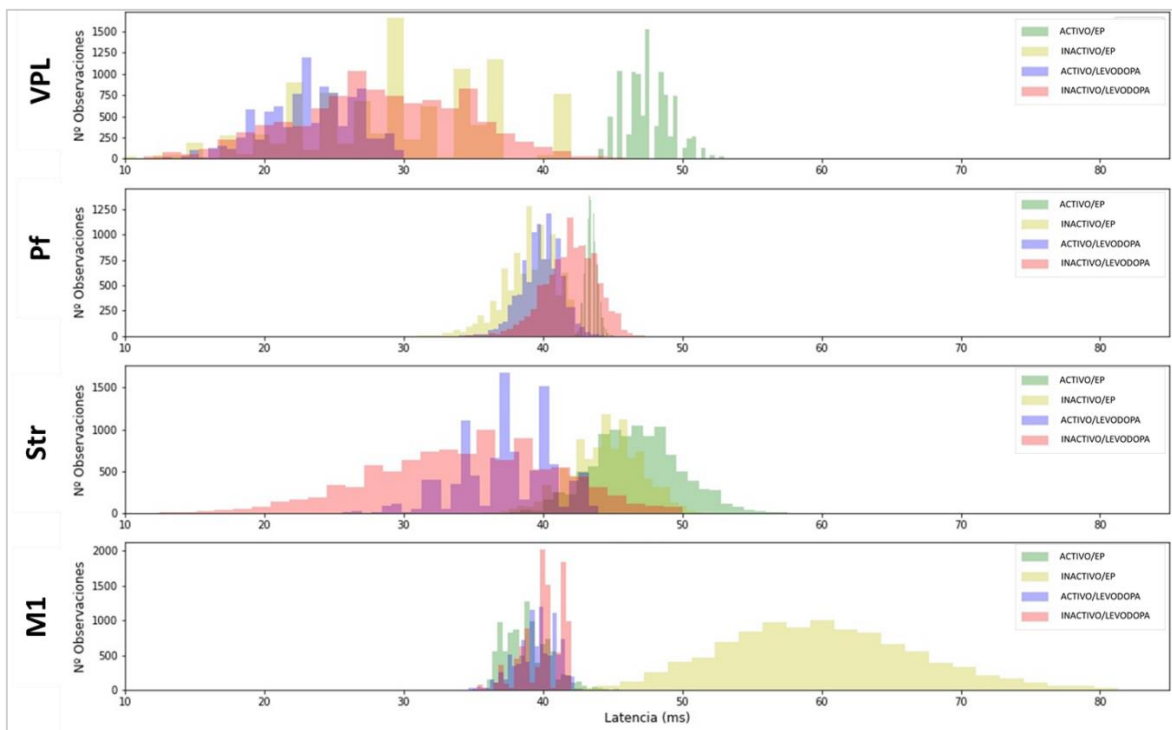


Fig. 10: Comparación de latencias por núcleos y estados utilizando el método *Boostrapping*. Rata R2

Además, al comparar las latencias entre áreas, se puede apreciar que la señal, independiente del estado, llega en general más temprano a VPL y luego a Str, Pf y M1.

Dado que en la rata R1 no se observó consistencia entre los resultados del análisis con pruebas no-paramétricas y la estimación por *bootstrapping*, aún más, el *bootstrapping* no produjo

distribuciones normales, se optó por considerar sólo los resultados de la rata R2 para efectos de concluir. En base a los resultados con ambos análisis se sugiere (con la reserva de que se trata de un resultado en una sola rata) que la EME produce una secuencia en la activación de estructuras supraespinales compatible con la conectividad VPL-Pf-STR-M1 y que la disponibilidad de dopamina puede afectar los tiempos de transmisión y por la tanto la secuencia de activación.

## **9. DISCUSIÓN**

Homologando la respuesta de la estimulación medular epidural, a los potenciales evocados somatosensoriales (PES), se puede observar que en el caso de los PES, las latencias máximas tienden a ser bastante consistentes, y frente a diferencias con los valores de referencia suelen existir cambios patológicos en la transmisión somatosensorial.(Macerollo et al., 2018). En base a ellos se buscó identificar diferencias entre las respuestas a la EME en animales sanos y modelados con EP, no obstante, debido a dificultades experimentales y del registro de señales corticales, en el presente trabajo no se contó con un control para realizar dicha comparación. A pesar de ello, los efectos obtenidos del registro con Levodopa pueden orientar a dicha respuesta, ya que de acuerdo con reportes previos (Fuentes, 2009; Santana et al., 2014), tanto la EME como la levodopa reducen efectivamente la excesiva coherencia en banda beta, acercando al circuito motor a un estado muy similar al normal, de modo que las ratas con tratamiento de L-dopa presentarían funcionamiento que permitiría la comparación con animales parkinsonianos.

En primera instancia se puede visualizar, que tal como está indicado en la literatura, la EME no solo tiene efectos locales, si no que al activar aferentes medulares alcanzaría estructuras subcorticales y corticales. (Fonoff et al., 2019) Es bien sabido que existe una interacción permanente entre la corteza somatosensorial y motora (Hsiao et al., 2018), así como que son estructuras que se modulan recíprocamente. (Veinante & Deschênes, 2003) Igualmente, estudios en PES han propuesto un rol integrador sensoriomotor del núcleo subtalámico (Trenado et al., 2017), sugiriendo así un sistema sensitivo motor acoplado, que sería potencialmente modificable al alterar uno de sus componentes, en este caso el input sensitivo proveniente de la activación de la vía columnas dorsales de la médula espinal, dando sustento al efecto de la EME en la enfermedad de Parkinson.

Respecto a los resultados de latencias por estados, se visualiza que la disponibilidad de dopamina en el sistema podría modular la respuesta supra espinal a la EME. En relación con la amplitud, se observa una mayor intensidad de la respuesta en estado activo parkinsoniano, lo cual podría indicar que en dicho estado existiría mayor cantidad de actividad eléctrica relacionada con el procesamiento (Macerollo et al., 2018), no obstante, esta respuesta podría deberse a otros motivos. Varios estudios mencionan que en condiciones normales la entrada somatosensorial se atenúa antes y durante el movimiento voluntario( Asanuma y col. 2003; Macerollo y col. 2016,(Macerollo et al., 2018), estando significativamente reducida durante el movimiento en relación al reposo (Brooke & Zehr, 2006). En condiciones patológicas esta activación se daría de modo anormal y no se lograría atenuar la señal, observándose respuestas anormalmente altas (Arpin et al., 2018; Macerollo et al., 2018). Este es un fenómeno que se ha descrito en humanos con EP, y sería reversible por medio de agonistas dopaminérgicos, levodopa y ECP (Macerollo et al., 2018), de modo

que la amplitud de las respuestas en ese estado podría también asociarse a características fisiopatológicas de la enfermedad.

Si bien los resultados actuales solo se presentan como una aproximación, sería de interés explorar dirigidamente diferencias de amplitud en la respuesta a EME, ya que según algunas propuestas (Arpin et al., 2018; Macerollo et al., 2018) la incapacidad para modular la amplitud de la actividad cortical somatosensorial podría asociarse a un pobre control motor.

De acuerdo a las latencias por área, se puede proponer una secuencia de activación compatible con la organización anatómica de la vía, de modo que la señal se transmitiría desde columnas dorsales, vía lemnisco-medial, hasta VPL, Pf, STR y corteza, indicando que la EME tendría efecto tanto en VPL como en Pf, pudiendo así facilitar un acceso temprano a la modulación de la actividad al circuito de los Ganglios Basales, por medio de las proyecciones de Pf a estriado sensoriomotor.

Se destaca que esta secuencia de activación sólo se cumplió en estados con presencia de Levodopa, ya que cuando el animal estuvo en estado parkinsoniano la activación comenzó por M1, seguido de Pf y Vpl. Asimismo, la latencia aumenta en los estados parkinsonianos en comparación a los con levodopa.

En base a esto se podría presumir que la dopamina tendría participación en la modulación de la transmisión de información somatosensorial proveniente desde la periferia, lo cual sería consecuente con las alteraciones en el procesamiento somatosensorial reportado en la EP, justamente en modalidades sensitivas dependientes de la vías de las CDLM, como lo son la propiocepción y el tacto (Conte et al., 2013; Lee et al., 2018; Nelson et al., 2018). Estas

alteraciones respondería a la medicación dopaminérgica (Lee et al., 2018; Weinberger et al., 2006).

Se sugiere que la modificación en la temporalidad de la activación de diferentes estructuras podría interferir en la integración sensoriomotora, de modo que el sistema dispondría tardíamente de la información sensitiva para planificar, realizar ajustes y ejecutar un movimiento, interfiriendo así con la calidad de la respuesta.

Por último, es importante mencionar que la discrepancia de los resultados entre los dos animales podría tener su origen en la diferencia en la severidad de la lesión, en la diferente posición del electrodo de estimulación sobre la médula espinal (por ejemplo, una posición más lateralizada sobre la médula), y también en posiciones diferentes de los electrodos de registro. Esto, en conjunto al bajo número de animales analizados, explica que los resultados planteados solo constituyen una aproximación a la problemática, y la necesidad de profundizar sobre los mismos.

## 10. REFERENCIAS

- Ahlskog, J. E., & Muentner, M. D. (2001). Frequency of Levodopa-Related Dyskinesias and Motor fluctuations.pdf. *Movement Disorders*, 16(3), 448–458.  
<https://doi.org/10.1002/mds.1090>
- Albin, R. L., Young, A. B., Penney, J. B., Roger, L. A., & Young, B. B. (1989). *perspectives on disease The functional anatomy of basal ganglia disorders*. 12(10).
- Arpin, D. J., Gehringer, J. E., Wilson, T. W., & Kurz, M. J. (2018). Movement-Related Somatosensory Activity Is Altered in Patients with Multiple Sclerosis. *Brain Topography*, 31(4), 700–707. <https://doi.org/10.1007/s10548-018-0632-0>
- Aum, D. J., & Tierney, T. S. (2018). Deep brain stimulation: Foundations and future trends. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 23(1), 162–182. <https://doi.org/10.2741/4586>
- Brooke, J. D., & Zehr, E. P. (2006). Limits to fast-conducting somatosensory feedback in movement control. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 34(1), 22–28.  
<https://doi.org/10.1097/00003677-200601000-00006>
- Brys, I., Nunes, J., & Fuentes, R. (2017). Motor deficits and beta oscillations are dissociable in an alpha-synuclein model of Parkinson’s disease. *European Journal of Neuroscience*, 46(3), 1906–1917. <https://doi.org/10.1111/ejn.13568>
- Cai, Y., Reddy, R. D., Varshney, V., & Chakravarthy, K. V. (2020). Spinal cord stimulation in Parkinson’s disease: a review of the preclinical and clinical data and future prospects. *Bioelectronic Medicine*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s42234-020-00041-9>
- Charlton, C. S., Ridding, M. C., Thompson, P. D., & Miles, T. S. (2003). Prolonged peripheral nerve stimulation induces persistent changes in excitability of human motor cortex. *Journal of the Neurological Sciences*, 208(1–2), 79–85.

[https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(02\)00443-4](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(02)00443-4)

Conte, A., Khan, N., Defazio, G., Rothwell, J. C., & Berardelli, A. (2013). Pathophysiology of somatosensory abnormalities in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 9(12), 687–697. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.224>

de Andrade, E. M., Ghilardi, M. G., Cury, R. G., Barbosa, E. R., Fuentes, R., Teixeira, M. J., & Fonoff, E. T. (2016). Spinal cord stimulation for Parkinson's disease: a systematic review. *Neurosurgical Review*, 39(1), 27–35. <https://doi.org/10.1007/s10143-015-0651-1>

Estelle, S., Song, K., Suh, J. F., Hwang, D., & Youn, I. (2015). Short communication A time-course study of behavioral and electrophysiological characteristics in a mouse model of different stages of Parkinson's disease using 6-hydroxydopamine. *Behavioural Brain Research*, 284, 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.019>

Fonoff, E. T., de Lima-Pardini, A. C., Coelho, D. B., Monaco, B. A., Machado, B., de Souza, C. P., Ghilardi, M. G. D. S., & Hamani, C. (2019). Spinal cord stimulation for freezing of gait: From bench to bedside. *Frontiers in Neurology*, 10(AUG). <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00905>

Fuentes, R. (2009). *Spinal Cord Stimulation Restores Locomotion in Animal Models of Parkinson's Disease*. 1578. <https://doi.org/10.1126/science.1164901>

Fuentes, R., Petersson, P., & Nicoletis, M. A. L. (2010). Restoration of locomotive function in Parkinson's disease by spinal cord stimulation: Mechanistic approach. *European Journal of Neuroscience*, 32(7), 1100–1108. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07417.x>

Groenewegen, H. J. (2003). The basal ganglia and motor control. *Neural Plasticity*, 10(1–2), 107–120. <https://doi.org/10.1155/NP.2003.107>

- Haber, S. N. (2014). The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. *Neuroscience*, 282, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.008>
- Haber, Suzanne N. (2016). Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1), 7–21. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6434-1\\_135-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6434-1_135-1)
- Herrero, M. T., Barcia, C., & Navarro, J. M. (2002). Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Child's Nervous System*, 18(8), 386–404. <https://doi.org/10.1007/s00381-002-0604-1>
- Hsiao, F. J., Chen, W. T., & Lin, Y. Y. (2018). Association between stimulus-evoked somatosensory inhibition and movement-related sensorimotor oscillation: A magnetoencephalographic study. *Neuroscience Letters*, 664, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.014>
- Jensen, M. P., & Brownstone, R. M. (2019). Mechanisms of spinal cord stimulation for the treatment of pain: Still in the dark after 50 years. *European Journal of Pain (United Kingdom)*, 23(4), 652–659. <https://doi.org/10.1002/ejp.1336>
- Jeon, Y. H. (2012). Spinal cord stimulation in pain management: A review. *Korean Journal of Pain*, 25(3), 143–150. <https://doi.org/10.3344/kjp.2012.25.3.143>
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Koesler, I. B. M., Dafotakis, M., Ameli, M., Fink, G. R., & Nowak, D. A. (2009). Electrical somatosensory stimulation improves movement kinematics of the affected hand following stroke. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 80(6), 614–619. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.161117>
- Kogan, M., McGuire, M., & Riley, J. (2019). Deep Brain Stimulation for Parkinson Disease. *Neurosurgery Clinics of North America*, 30(2), 137–146.

<https://doi.org/10.1016/j.nec.2019.01.001>

- Kojima, S., Miyaguchi, S., Sasaki, R., Tsuiki, S., Saito, K., Inukai, Y., Otsuru, N., & Onishi, H. (2019). The effects of mechanical tactile stimulation on corticospinal excitability and motor function depend on pin protrusion patterns. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53275-2>
- Lanciego J, Luquin N, O. J. (2012). Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 20(4), 691–704. [https://doi.org/10.1016/S0193-953X\(05\)70340-3](https://doi.org/10.1016/S0193-953X(05)70340-3)
- Lee, M. S., Lee, M. J., Conte, A., & Berardelli, A. (2018). Abnormal somatosensory temporal discrimination in Parkinson’s disease: Pathophysiological correlates and role in motor control deficits. *Clinical Neurophysiology*, 129(2), 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2017.11.022>
- Lewitt, P. (2008). Levodopa for the Treatment of Parkinson ’ s Disease. *The New England Journal of Medicine Clinical*, 2–5.
- Macerollo, A., Brown, M. J. N., Kilner, J. M., & Chen, R. (2018). Neurophysiological Changes Measured Using Somatosensory Evoked Potentials. *Trends in Neurosciences*, 41(5), 294–310. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.02.007>
- McGregor, M. M., & Nelson, A. B. (2019). Circuit Mechanisms of Parkinson’s Disease. In *Neuron* (Vol. 101, Issue 6, pp. 1042–1056). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.004>
- Morgante, L., Morgante, F., Moro, E., Epifanio, A., Girlanda, P., Ragonese, P., Antonini, A., Barone, P., Bonuccelli, U., Contarino, M. F., Capus, L., Ceravolo, M. G., Marconi, R., Ceravolo, R., D’Amelio, M., & Savettieri, G. (2007). How many parkinsonian patients are suitable candidates for deep brain stimulation of subthalamic nucleus?

Results of a questionnaire. *Parkinsonism and Related Disorders*, 13(8), 528–531.

<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2006.12.013>

Nelson, A. J., Hoque, T., Gunraj, C., & Chen, R. (2018). Altered somatosensory processing in Parkinson's disease and modulation by dopaminergic medications. *Parkinsonism and Related Disorders*, 53, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.05.002>

Pavlidis, C., Miyashita, E., & Asanuma, H. (1993). Projection from the sensory to the motor cortex is important in learning motor skills in the monkey. *Journal of Neurophysiology*, 70(2), 733–741. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.2.733>

Santana, M. B., Halje, P., Simplício, H., Richter, U., Freire, M. A. M., Petersson, P., Fuentes, R., & Nicolelis, M. A. L. (2014a). Spinal cord stimulation alleviates motor deficits in a primate model of parkinson disease. *Neuron*, 84(4), 716–722.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.061>

Santana, M. B., Halje, P., Simplício, H., Richter, U., Freire, M. A. M., Petersson, P., Fuentes, R., & Nicolelis, M. A. L. (2014b). Spinal cord stimulation alleviates motor deficits in a primate model of parkinson disease. *Neuron*, 84(4), 716–722.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.061>

Shinko, A., Agari, T., Kameda, M., Yasuhara, T., Kondo, A., Tayra, J. T., Sato, K., Sasaki, T., Sasada, S., Takeuchi, H., Wakamori, T., Borlongan, C. V., & Date, I. (2014). Spinal cord stimulation exerts neuroprotective effects against experimental Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 9(7), 1–8.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101468>

The, I., Ganglia, B., Editors, V., Science, P. J. S., Media, B., York, N., Boraud, T., Brown, P., Goldberg, J. A., Graybiel, A. M., & Magill, P. J. (2005). *OSCILLATIONS IN THE BASAL GANGLIA : The good , the bad , and the unexpected*. 3–24.

- Tinkhauser, G., Pogosyan, A., Little, S., Beudel, M., Herz, D. M., Tan, H., & Brown, P. (2017). *The modulatory effect of adaptive deep brain stimulation on beta bursts in Parkinson ' s disease*. 1053–1067. <https://doi.org/10.1093/brain/awx010>
- Trenado, C., Elben, S., Friggemann, L., Gruhn, S., Groiss, S. J., Vesper, J., Schnitzler, A., & Wojtecki, L. (2017). Long-latency somatosensory evoked potentials of the subthalamic nucleus in patients with Parkinson's disease. *PLoS ONE*, *12*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168151>
- Tu-Chan, A. P., Natraj, N., Godlove, J., Abrams, G., & Ganguly, K. (2017). Effects of somatosensory electrical stimulation on motor function and cortical oscillations. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, *14*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12984-017-0323-1>
- Veinante, P., & Deschênes, M. (2003). Single-cell study of motor cortex projections to the barrel field in rats. *Journal of Comparative Neurology*, *464*(1), 98–103. <https://doi.org/10.1002/cne.10769>
- Weinberger, M., Mahant, N., Hutchison, W. D., Lozano, A. M., Moro, E., Hodaie, M., Lang, A. E., Dostrovsky, J. O., Mahant, N., Hutchison, W. D., Lozano, M., Moro, E., Hodaie, M., Lang, A. E., & Dostrovsky, J. O. (2006). *Beta Oscillatory Activity in the Subthalamic Nucleus and Its Relation to Dopaminergic Response in Parkinson ' s Disease*. 3248–3256. <https://doi.org/10.1152/jn.00697.2006>.
- Yadav, A. P., Fuentes, R., Zhang, H., Vinholo, T., Wang, C. H., Freire, M. A. M., & Nicolelis, M. A. L. (2014). Chronic spinal cord electrical stimulation protects against 6-hydroxydopamine lesions. *Scientific Reports*, *4*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep03839>
- Yadav, A. P., & Nicolelis, M. A. L. (2017). Electrical stimulation of the dorsal columns of

the spinal cord for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 32(6), 820–832.

<https://doi.org/10.1002/mds.27033>

Yelnik, J. (2008). Modeling the organization of the basal ganglia. *Revue Neurologique*,

164(12), 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2008.04.019>

## 11. MATERIAL COMPLEMENTARIO

Tabla 1: Comparación de latencias para rata R1 en las 4 combinaciones de estado y condición experimental (inactivo Parkinsoniano, activo Parkinsoniano, inactivo-levodopa, activo-levodopa) no se observaron diferencias significativas (test de Wilcoxon,  $p > 0.0083$ , que corresponde a un  $p = 0,05$  corregido por 6 comparaciones).

<b>VPL</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
Inactivo/PD				
Inactivo/Levodopa	0.4			
Activo/PD	0.312	0.5		
Activo/Levodopa	0.218	0.25	0.185	
<b>Pf</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
Inactivo/PD				
Inactivo/Levodopa	0.5			
Activo/PD	0.5	0.5		
Activo/Levodopa	0.5	0.25	0.25	
<b>STR</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
Inactivo/PD				
Inactivo/Levodopa	0.343			
Activo/PD	0.109	0.015		
Activo/Levodopa	0.468	0.109	0.218	
<b>M1</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
Inactivo/PD				
Inactivo/Levodopa	0.125			
Activo/PD	0.125	0.25		
Activo/Levodopa	0.0625	0.0625	0.25	

Tabla 2: Comparación de latencias para rata R2 en las 4 combinaciones de estado y condición experimental (inactivo Parkinsoniano, activo Parkinsonian, inactivo-levodopa, activo-levodopa) no se observaron diferencias significativas (test de Wilcoxon,  $p > 0.0083$ , que corresponde a un  $p = 0,05$  corregido por 6 comparaciones).

<b>VPL</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.562			
<b>Activo/PD</b>	0.0312	0.0312		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.312	0.437	0.0312	
<b>Pf</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.0107			
<b>Activo/PD</b>	0.0017	0.48		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.45	0.0319	0.0176	
<b>STR</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.109			
<b>Activo/PD</b>	0.42	0.23		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.0039	0.42	0.078	
<b>M1</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.0078			
<b>Activo/PD</b>	0.0078	0.285		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.0039	0.28	0.32	

Tabla 3: Comparación de amplitud de la respuesta evocada en la rata R1 de acuerdo a estado motor/experimental por núcleo. Alfa 0.05, corregido por 6 comparaciones  $p= 0.0083$ . Amplitud expresada en unidades de puntaje Z robusto

<b>VPL</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.156			
<b>Activo/PD</b>	0.093	0.5		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.093	0.218	0.156	
<b>Pf</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.25			
<b>Activo/PD</b>	0.25	0.25		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.25	0.25	0.25	
<b>STR</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.034			
<b>Activo/PD</b>	0.0085	0.101		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.034	0.5	0.0549	
<b>M1</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.0625			
<b>Activo/PD</b>	0.437	0.0625		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.5625	0.0625	0.312	

Tabla 4: Comparación de amplitud de la respuesta evocada en la rata R2 de acuerdo a estado motor/experimental por núcleo. Alfa 0.05, corregido por 6 comparaciones  $p= 0.0083$ . Amplitud expresada en unidades de puntaje Z robusto

<b>VPL</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.0625			
<b>Activo/PD</b>	0.21875	0.0625		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.03125	0.09375	0.0625	
<b>Pf</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.194			
<b>Activo/PD</b>	3.05176E-05	3.05176E-05		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.227	0.114654541	6.10352E-05	
<b>STR</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.0234375			
<b>Activo/PD</b>	0.47265625	0.19140625		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.2734375	0.00390625	0.421875	
<b>M1</b>	<b>Inactivo/PD</b>	<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>Activo/PD</b>	<b>Activo/Levodopa</b>
<b>Inactivo/PD</b>				
<b>Inactivo/Levodopa</b>	0.101			
<b>Activo/PD</b>	0.0039	0.013		
<b>Activo/Levodopa</b>	0.0273	0.0273	0.15	

Tabla 5: Comparación de latencias por núcleos, de acuerdo con estado motor/experimental, Rata R1 Mann Whitney Test

<b>Agrupadas</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
VPL				
Pf	3.8608734E-06			
Str	3.9912098E-01	2.8552882E-05		
M1	0.39	0.006	0.42	
<b>Inactivo/PD</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
VPL				
Pf	0.095			
Str	0.462	0.085		
M1	0.277	0.066	0.274	
<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
VPL				
Pf	0.047			
Str	0.351	0.038		
M1	0.277	0.066	0.065	
<b>Activo/PD</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
VPL				
Pf	0.047			
Str	0.424	0.038		
M1	0.452	0.26	0.205	
<b>Activo/Levodopa</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
VPL				
Pf	0.047			
Str	0.424	0.038		
M1	0.206	0.4	0.065	

Tabla 6: Comparación de latencias por núcleos, de acuerdo con estado motor/experimental, Rata R2 Mann Whitney Test

<b>Agrupadas</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
<b>VPL</b>				
<b>Pf</b>	0.0253			
<b>Str</b>	0.015	0.084		
<b>M1</b>	0.035	0.173	0.17	
<b>Inactivo/PD</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
<b>VPL</b>				
<b>Pf</b>	0.0395			
<b>Str</b>	0.0363	0.0468		
<b>M1</b>	0.024	0.021	0.02	
<b>Inactivo/Levodopa</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
<b>VPL</b>				
<b>Pf</b>	0.03			
<b>Str</b>	0.26	0.371		
<b>M1</b>	0.115	0.197	0.433	
<b>Activo/PD</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
<b>VPL</b>				
<b>Pf</b>	0.008			
<b>Str</b>	0.324	0.48		
<b>M1</b>	0.014	0.0014	0.027	
<b>Activo/Levodopa</b>	<b>VPL</b>	<b>Pf</b>	<b>Str</b>	<b>M1</b>
<b>VPL</b>				
<b>Pf</b>	0.0002			
<b>Str</b>	0.054	0.344		
<b>M1</b>	0.0019	0.284	477	