



## Efecto de la exposición a campos magnéticos de extrema baja frecuencia en un modelo de hemiparkinson en ratas.

Effect of extremely low frequency magnetic fields exposure in hemiparkinson disease rat model.

Jacqueline Moreno-Fitz<sup>1</sup>, Idalia Medina-Salazar<sup>1</sup>, Viridiana Chávez-Hernández<sup>1</sup>, David Elías-Viñas<sup>2</sup> y Leticia Verdugo-Díaz<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioelectromagnetismo, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México, D.F.

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Eléctrica, Sección de Bioelectrónica, CINVESTAV, IPN, México, D.F.

Recibido: 24 de abril de 2015

Aceptado: 29 de junio de 2015

Puedes encontrar este artículo en: <http://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2015/12/12.html>

### Resumen

Introducción: La Enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento degenerativo, el cual afecta las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta del mesencéfalo (SNc). Se manifiesta por movimientos anormales con pérdida progresiva de habilidades motoras y cognitivas. Actualmente no existe un tratamiento completamente eficaz, por tal motivo es muy importante establecer herramientas terapéuticas para aliviar o al menos retardar la expresión de los síntomas de la enfermedad. Una de las más novedosas estrategias es la estimulación magnética de extrema baja frecuencia, cuyos efectos en la EP no han sido estudiados. Objetivo: El propósito de este estudio fue evaluar los efectos conductuales en ratas en un modelo de hemiparkinsonismo, inducidos por la exposición a campos magnéticos de extrema baja frecuencia (CM). Material y métodos: En este estudio inyectamos 6-hidroxidopamina en la SNc para lesionar la vía nigroestriatal derecha de ratas Wistar. Después de la lesión, los animales fueron estimulados con CM (60 Hz, 2.4 mT) 2 horas diarias durante 2 meses. Los cambios en postura, locomoción y equilibrio se evaluaron cada 15 días. Resultados: Los principales resultados obtenidos mostraron que la estimulación diaria mejoró el equilibrio y redujo algunos parámetros relacionados con la ansiedad, medidos estos últimos con la prueba de campo abierto. Conclusión: Basados en estos resultados, proponemos que los parámetros de estimulación con CM en el modelo animal de la EP son adecuados para mejorar algunos síntomas motores de EP y que podrían ser una alternativa en el tratamiento de los pacientes con este padecimiento.

**Palabras clave:** Enfermedad de Parkinson, Estimulación magnética, Tirosina hidroxilasa, Equilibrio, Campo abierto.

### Abstract

Introduction: Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative illness which affects dopaminergic neurons in the substance nigra pars compacta (SNc) at the mesencephalic area. It is characterized by abnormal movements with progressive loss of motor and cognitive skills. Up to date there is no completely effective treatment. This is why it is very important to establish therapeutic tools to alleviate or at least retard the expression of the PD symptoms. One of the most novel strategies is electromagnetic stimulation of extremely low frequency, whose effects on PD have not been well studied. Objective: The main purpose of this study was to evaluate behavioral effects of extremely low frequency magnetic fields (MF) on a rat model of hemiparkinsonism. Material and methods: In this study we injected 6-hydroxydopamine into the SNc to lesion the nigrostriatal pathway of the right side of Wistar rat's brain. After the lesion, the animals were stimulated with MF (60 Hz, 2.4 mT) daily during 2 hours for 2 months. Changes in posture, locomotion and equilibrium were every 15 days measured. Results: The main results showed that daily stimulation improved equilibrium and reduced anxiety parameters, measured by open field test. Conclusion: Based in these results we propose that the ELF MF stimulation parameters are useful to ameliorate some of the motor symptoms the PD and could be an alternative in the treatment for PD patients.

**Key words:** Parkinson's disease, Magnetic stimulation, Tyrosine hydroxylase, Balance, Open field test.

\*Correspondencia: Edificio A, 5° piso, Facultad de Medicina, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria. México, D.F. CP 04510. Teléfono: 56232341 o 56232347 e-mail: [leticia@unam.mx](mailto:leticia@unam.mx)

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons license, (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>), which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



## 1. Introducción

El efecto de los campos magnéticos de extrema baja frecuencia (CM) en los seres vivos ha mostrado influencias en diversos parámetros fisiológicos y moleculares.<sup>1</sup> En particular la conducta y los neurotransmisores cerebrales varían por influencia de CM.<sup>1,2</sup> Algunos autores han reportado que la estimulación con CM puede modificar los tejidos expuestos, en particular el sistema nervioso, induciendo cambios en la excitabilidad y liberando factores involucrados en los procesos de neuroprotección. Por ejemplo, en un modelo de traumatismo craneoencefálico en ratas, cuando se aplicaron CM se observó un aumento en la neuroprotección, medida a través de parámetros moleculares.<sup>3</sup> En un modelo animal de la enfermedad de Huntington, después de la estimulación durante 21 días con CM, se reportaron varias diferencias en conductas motoras y aumento en los niveles de factores neurotróficos, reduciendo el daño oxidativo y la pérdida neuronal.<sup>4</sup>

Esto ha llevado a varios investigadores a intentar usar estos campos magnéticos como posible terapia en enfermedades con desórdenes del movimiento en humanos, como es el caso de la enfermedad de Parkinson (EP).<sup>5</sup> Este padecimiento inicia como consecuencia de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, principalmente de la vía nigroestriatal y está caracterizado por síntomas motores como temblor en reposo, bradicinesia, rigidez, inestabilidad postural, alteraciones en la marcha, micrografía y dificultad para realizar tareas finas, además de afecciones no motoras, como alteraciones autonómicas, sexuales, del sueño, gastrointestinales, sensitivas y neuropsiquiátricas.<sup>6</sup>

El síntoma inicial más frecuente es el temblor en reposo con una frecuencia de tres a seis ciclos/segundo. La inestabilidad postural es uno de los últimos síntomas motores en aparecer, ésta se debe a una pérdida de los reflejos posturales. El diagnóstico de Enfermedad de Parkinson se

realiza a través de los criterios del Banco de Cerebros del Reino Unido. Los pacientes con esta enfermedad comúnmente son tratados con levodopa (L-dopa). La L-dopa puede provocar discinesias después de algunos meses de administración; se estima que éstas se presentan en el 60% de los pacientes después de 3 ó 4 años de iniciado el manejo con levodopa.<sup>6</sup>

Para reproducir un estado de Parkinsonismo en ratas se ha usado la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), con el fin de lesionar el sistema nigroestriatal dopaminérgico, similar a lo que sucede en la enfermedad de Parkinson.<sup>7</sup> El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos conductuales en ratas en un modelo de hemiparkinsonismo, inducidos por la exposición a campos magnéticos de extrema baja frecuencia. Esto se realizó sometiendo a los animales a CM diariamente durante dos meses y evaluando los cambios en la conducta. Con base en resultados previos,<sup>8</sup> proponemos que los CM pueden actuar como un factor neuroprotector que retrasaría la evolución natural de la lesión y por lo tanto, esto se vería reflejado en algunas conductas relacionadas con la enfermedad como son la locomoción, el equilibrio y la ansiedad.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Ratas

Se utilizaron 58 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 180-200 g al iniciar el experimento, distribuidas en grupos de 2 animales por caja de acrílico (16x37x18cm), bajo las mismas condiciones de temperatura (20-22°C), ciclos de luz: oscuridad (12:12), comida y agua a libre demanda. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a los principios enunciados en las guías de cuidado y uso de animales en investigación.<sup>9</sup>

### 2.2. Diseño experimental

Las pruebas de conducta se realizaron en el periodo entre 10:00 am y 3:00 pm a cada uno de los animales durante las dos primeras

semanas antes de iniciar la estimulación electromagnética o la falsa estimulación, esto con el fin de tener información basal. En particular, la prueba de giro inducida con anfetamina nos permitió valorar el tamaño de la lesión como demuestra Truong y colaboradores.<sup>7</sup> Con dicha prueba se valoró que los animales estuvieran correctamente lesionados y de esta manera se obtuvo el criterio de inclusión al experimento. Los animales se agruparon en seis grupos experimentales: Intacta (I, n= 12), Intacta expuesta a CM (I+ CM, n=6), Falsa lesión (Sham, n=6), Falsa lesión expuesta a CM (Sham + CM, n=6), Lesionada con 6- OHDA (Lx, n=14) y Lesionadas expuesta a CM (Lx+ CM, n=14).

Se evaluó la conducta de los animales durante los siguientes 2 meses después de la estimulación y al finalizar este período, los animales fueron anestesiados y perfundidos con solución de paraformaldehído al 4% en buffer salino de fosfatos (PBS). Posteriormente se obtuvo el cerebro para realizar una inmunohistoquímica contra tiroxina hidroxilasa (TH).

### 2.3. Lesiones y cirugías

La lesión fue realizada en el haz nigroestriatal derecho con 6-OHDA (Sigma H8523) o solución salina según el grupo (Lx o Sham). Cada roedor fue anestesiado intraperitoneal con una mezcla de ketamina (Anesket) 66 mg/kg, hidrocloreuro de xylazine (Rompum) 0.26 mg/kg y acepromazine (Calmivet) 1.3 mg/kg y colocado en un estereotáxico de ratas (Stoelting). Se realizó una incisión medial en la cabeza para exponer y visualizar la línea de sutura bregma. Se localizó el área de interés con base en las coordenadas AP=-2.8, L=-1.5 y V=-8.8.<sup>10</sup> En ese punto se hizo una perforación del cráneo con la ayuda de un taladro odontológico (Dremel, Modelo 225). Se introdujo una jeringa Hamilton (10µl de capacidad) y se inyectó 4µl de la solución

de 6-OHDA (2 mg de 6-OHDA y 10 mg de ácido ascórbico disueltos en 2 ml de solución salina); descendiendo la aguja lentamente a través del tejido, se infundió la toxina a una velocidad de 1µl/min durante 4 minutos. La aguja fue retirada en el transcurso de 5 min para prevenir la difusión de la toxina. En el caso de los animales Sham se infundió solución salina (4 µl). La herida fue afrontada con sutura quirúrgica trenzada (5/0) y se colocó antiséptico. Los animales se dejaron recuperar durante una semana antes de iniciar las pruebas conductuales y la estimulación.

### 2.4. Sistema de exposición a campo magnético

El CM fue generado por un par de bobinas en configuración Helmholtz (diámetro interior 30 cm) compuesto de alambre de cobre (18-gauge, 350 vueltas) diseñadas y construidas en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN (México D.F.).<sup>11</sup> Las bobinas fueron energizadas con una corriente sinusoidal de 60 Hz, produciendo un campo homogéneo. El campo magnético alterno generado tenía una inducción magnética promedio de 2.4 mT, medido con un gaussómetro (Alpha-Lab, Salt Lake City, UT, USA). Las líneas de fuerza magnética atravesaban el cuerpo del animal en forma transversal. El ruido ambiental del campo magnético no excedió el valor de <0.4 mT.

La exposición a CM se realizó dos horas diarias durante los dos meses del estudio a los subgrupos correspondientes. La caja de acrílico donde normalmente vivían los animales, sin su tapa metálica, se introdujo en medio del par de bobinas durante los periodos de estimulación (Figura 1). La temperatura dentro de las cajas fue 23.4±0.4°C, dicho parámetro permaneció constante durante las 2 horas de estimulación.



Figura 1. Fotografía del dispositivo de estimulación magnética. Par de bobinas en configuración Helzthoth colocadas por arriba y debajo de la caja de acrílico donde vivían los animales.

## 2.5. Pruebas conductuales

Todas las pruebas conductuales fueron realizadas antes de las estimulaciones o falsas estimulaciones (valores basales), las cuales fueron ejecutadas y analizadas por una persona que desconocía a cuál grupo pertenecía cada animal. Después de iniciar la estimulación, se hicieron las mismas pruebas cada 15 días. Las pruebas realizadas fueron: giros inducidos por anfetamina, giros sobre su eje corporal (“curling”), barra de equilibrio y campo abierto.

### 2.5.1. Giros inducidos por anfetamina

La disminución de los giros ipsilaterales inducidos por la administración de anfetamina nos orienta acerca del grado de recuperación de los niveles de dopamina en el lado lesionado, dado que esta droga induce la liberación de dopamina. La prueba se evalúa colocando cada rata en un cilindro de plástico (diámetro 40 cm y 20 cm de alto) posterior a la administración intraperitoneal con D-anfetamina (5 mg/kg de peso). Después de 5 minutos de la inyección se inicia la evaluación del número total de giros hechos hacia el sitio de la lesión menos

aquellos realizados hacia el lado contrario, durante 60 minutos. Los resultados se presentan como el porcentaje de cambio con respecto al número de giros obtenidos en la prueba basal, considerando éstos como el 100%.

### 2.5.2. Evaluación de la postura “curling”

En esta prueba se sostiene al roedor del último tercio de la cola y es elevado en posición vertical 1 a 2 cm durante 1 minuto. Se registra si se observa una desviación del cuerpo de  $10^{\circ}$  o más hacia una u otra dirección (izquierda o derecha), tomando como referencia el eje corporal vertical del animal. Si no muestra preferencia para inclinar la cabeza a la izquierda o la derecha se califica como cero.

### 2.5.3. Barra de equilibrio

Se coloca al roedor sobre una barra de madera de 1 cm de grosor y 100 cm de largo, elevada a 80 cm del piso. Previo a iniciar la prueba, se debe entrenar a los roedores tomándolos de la cola y colocándolos en la primera ocasión a 25 cm

de la caja de acrílico, e impulsándolos a caminar por la barra hasta llegar a una caja de acrílico con aserrín que ellos identifican como área segura, posteriormente se entrena a distancias de 50cm, 75cm y finalmente a 1 metro. Posteriormente se inicia la prueba dejando al animal en el extremo distal a la caja y con un cronómetro se toma el tiempo que tardan en llegar al otro extremo y tocar la caja. Una vez entrenadas, se realiza la prueba por 5 ocasiones. Si la rata no termina el recorrido o no toca la caja, se registra como 120 segundos (tiempo máximo de ejecución).

#### 2.5.4. Campo abierto

Se utiliza un área de acrílico negro de forma cuadrada (90 cm x 90 cm x 30 cm de altura). El animal se coloca en el centro y se realiza una videograbación durante 15 minutos. Después se analiza el video cuantificando los siguientes parámetros: distancia recorrida, número de toques en las paredes laterales, tiempo sin movimiento y número de heces.

#### 2.6. Histología e inmunohistoquímica contra TH

Al finalizar los experimentos los animales se anestesiaron intraperitonealmente con 100 mg/kg de pentobarbital sódico (Nembutal) y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo del corazón, con 300 ml de solución salina (PBS, pH 7.2) seguido de 300 ml de paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7.2; concluido lo anterior se decapitaron y removieron los cerebros del cráneo, los cuales se depositaron en el fijador para su posterior corte. El tejido fue protegido en solución de sacarosa al 30% por 48 horas. Con un criostato (Leica CM 15105), se realizaron cortes coronales de 20 micras en la región del cuerpo estriado y la sustancia negra.

Se realizó una inmunohistoquímica, colocando los cortes en solución de peróxido al 1% en PBS por 10 min; después se incubaron por 24 horas a 4°C con un

antisuero policlonal antiTH 1:200 (Chemicon AB 152), en solución de PBS adicionada con 10% de suero de cabra fetal y 0.075% triton x-100; después de 3 lavados con PBS, se incubaron con suero biotinilado-anti oveja IgG 1:250 y fueron tratados con el complejo avidina-biotina usando el kit vectastain ABC (Rabbit IgG, Elite pK-6101).

#### 2.7. Análisis estadístico

La estadística de las pruebas conductuales se realizó usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y como post-hoc Kruskal-Wallis (prueba no paramétrica para valores continuos). Los resultados fueron expresados como la media aritmética  $\pm$  desviación estándar (DE) y la significancia estadística fue realizada con  $p < 0.05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Locomoción inducida por anfetamina

El porcentaje de cambio en los giros inducidos por la anfetamina durante los dos meses post estimulación magnética se muestra en la figura 2. En los animales lesionados que no recibieron ningún tratamiento aumentó el número de giros a lo largo del estudio, siendo éstos significativos respecto al valor basal a los 45 y 60 días, lo cual muestra que la lesión aumenta a medida que el tiempo pasa ( $F_{(4,58)} = 7.861$ ;  $p < 0.05$ ). El grupo de animales lesionados y que recibieron CM diariamente durante dos meses no mostró cambios en el número de giros con respecto a los que realizaban antes de la estimulación; sin embargo, sí se observó una pequeña tendencia a disminuir al final del experimento. Al comparar el grupo lesionado y estimulado con CM contra los animales únicamente lesionados, se observó una disminución significativa en el porcentaje de cambio a los 60 días de tratamiento ( $F_{(1,18)} = 7.861$ ;  $p = 0.0166$ ).

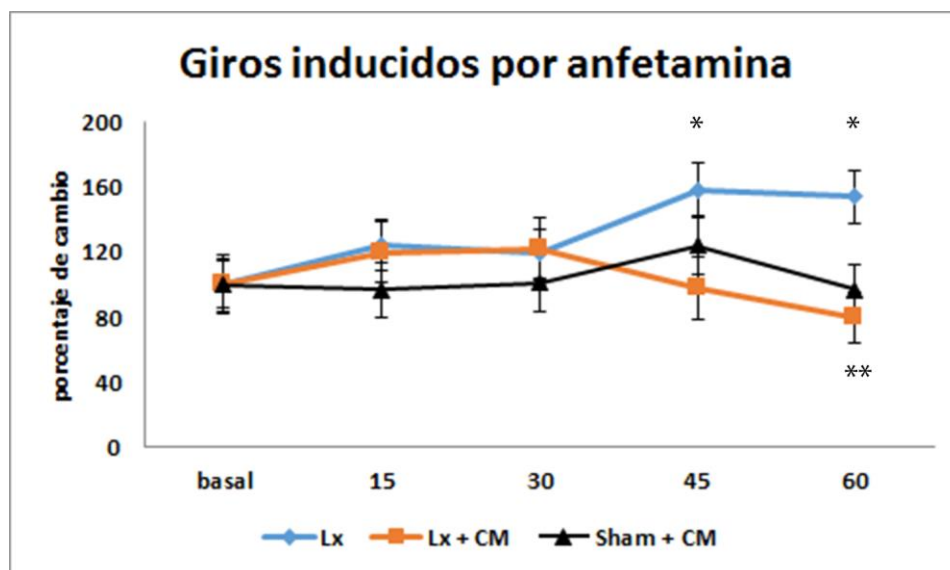


Figura 2. Giros inducidos por anfetamina. Promedio  $\pm$  DE del porcentaje de cambio de los giros hacia el lado ipsilateral a la lesión de cada grupo antes de iniciar la estimulación (basal) y a los 15, 30, 45 y 60 días después de la estimulación diaria con CM. El valor basal se consideró como 100% para cada grupo. ANOVA de una vía y post-hoc Kruskal-Wallis. \*  $p < 0.05$  versus Lx basal; \*\* $p < 0.05$  Lx + CM 60 días versus Lx 60 días.

### 3.2. Evaluación de la postura “curling”

En esta prueba que tiene como finalidad medir la postura, así como la tendencia hacia una u otra dirección con respecto al eje mayor del cuerpo, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados (datos no mostrados).

### 3.3. Evaluación de equilibrio

Esta prueba permite evaluar la motricidad de los animales y sobre todo el mantenimiento del equilibrio. Los animales intactos con o sin estimulación presentaron el menor tiempo en recorrer la barra y este no cambió al transcurrir los días del experimento (Figura

3). Los animales lesionados presentaron en la prueba basal el mayor tiempo de recorrido (poco más de 60 segundos). A medida que transcurre el experimento, los valores aumentaron en los animales con lesión (sin CM) en forma significativa hasta alcanzar a los 60 días el valor máximo ( $F_{(5,43)} = 3.217$ ,  $p=0.0149$ ). El grupo de animales lesionados que recibieron diariamente CM, mostraron una tendencia a disminuir el tiempo de recorrido de la barra a partir de la segunda evaluación (30 días). A los 60 días de estimulación el tiempo de recorrido en estos animales es significativamente menor en comparación con los animales lesionados que no fueron estimulados magnéticamente ( $F_{(5,13)} = 5.02$ ;  $p<0.05$ ).



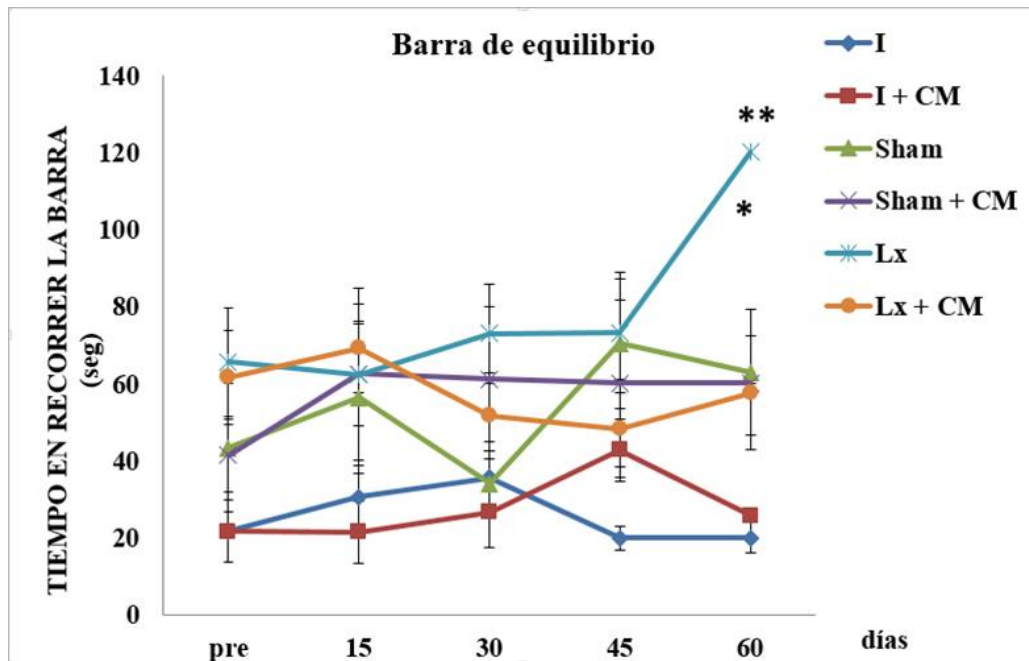


Figura 3. Tiempo que tardan los animales en recorrer la barra de equilibrio. Promedio  $\pm$  DE del tiempo de cada grupo antes de iniciar la estimulación (basal) y a los 15, 30, 45 y 60 días después de la estimulación diaria con CM. ANOVA de una vía y post-hoc Kruskal-Wallis. \* $p < 0.05$  Lx 60 días versus Lx basal y Lx 60 días versus Lx + CM 60 días; \*\*  $p < 0.01$  Lx 60 días versus I 60 días y versus I + CM 60 días.

### 3.4. Evaluación de la conducta en el campo abierto

Los parámetros de la prueba de campo abierto (distancia total recorrida, tiempo de inmovilidad y número de toques) se muestran en las tablas 1, 2 y 3. La distancia total recorrida durante los 15 minutos de la prueba (Tabla 1) muestra que los animales

lesionados recorrieron desde el principio menor distancia que los animales intactos y los animales con falsa lesión. En todos los grupos experimentales la distancia total recorrida disminuyó en las dos evaluaciones posteriores a la estimulación (30 y 60 días). Sin embargo, la disminución fue significativa solo en los animales intactos en la segunda evaluación ( $F_{(2,15)} = 6.898$ ;  $p = 0.0075$ ).

Grupos (n)	basal	30 días	60 días
I (12)	4168.3 $\pm$ 626.4	2141.2 $\pm$ 994.8	702.0 $\pm$ 203.4 *
I + CM (6)	4238.7 $\pm$ 484.8	3354.0 $\pm$ 524.6	2820.0 $\pm$ 259.1
Sham (6)	2985.0 $\pm$ 207.5	2212.5 $\pm$ 727.0	1730.0 $\pm$ 225.0
Sham + CM (6)	3157.5 $\pm$ 606.2	1997.5 $\pm$ 514.4	1995.0 $\pm$ 260.0
Lx (14)	1820.0 $\pm$ 345.2	1335.0 $\pm$ 304.4	1029.5 $\pm$ 399.9
Lx + CM (14)	1750.5 $\pm$ 316.4	1604.3 $\pm$ 321.2	1216.1 $\pm$ 331.6

Tabla 1. Distancia total recorrida (cm) durante los 15 minutos de la prueba en campo abierto. Promedio  $\pm$  DE de cada grupo antes de iniciar la estimulación (basal) y a los 30 y 60 días después de la estimulación diaria con CM. ANOVA de una vía y post-hoc Kruskal-Wallis. \* $p < 0.05$  versus I basal.

La tabla 2 muestra el promedio del tiempo total sin movimiento de los animales (sin desplazamiento pero tampoco movimientos estereotipados como rascados, olfateo, etc.). El tiempo que permanecieron inmóviles los animales intactos aumentó significativamente a los 60 días en comparación con su valor basal ( $F_{(2,15)} = 8.856$ ;  $p=0.0061$ ), lo cual se relaciona con lo observado en la tabla 1, donde a los dos meses se desplazaron menos

y por lo tanto aumentaron el tiempo de inmovilidad. El tiempo de inmovilidad de los animales intactos que recibieron durante dos meses estimulación magnética no cambió significativamente a lo largo del experimento. Los animales lesionados también aumentaron su tiempo de inmovilidad a los 60 días al compararlo contra su valor basal ( $F_{(2,25)} = 6.743$ ;  $p<0.05$ ).

Grupos (n)	basal	30 días	60 días
I (12)	240.7 ± 83.8	354.0 ± 113.7	865.0 ± 10.9 **
I + CM (6)	241.5 ± 18.7	312.5 ± 2.4	295.2 ± 20.6
Sham (6)	378.0 ± 123.0	487.75 ± 101.1	597.5 ± 86.5
Sham + CM (6)	349.2 ± 211.6	503.6 ± 118.0	658.0 ± 73.0
Lx (14)	263.4 ± 28.5	453.6 ± 2.3	785.0 ± 25.9 *
Lx + CM (14)	251.6 ± 30.8	305.0 ± 61.1	516.5 ± 43.9

Tabla 2. Tiempo total de inmovilidad (seg) en el campo abierto. Promedio + DE de cada grupo antes de iniciar la estimulación (basal) y a los 30 y 60 días después de la estimulación diaria con CM. ANOVA de una vía y post hoc Kruskal-Wallis. \*\* $p<0.05$  I 60 días versus I basal y versus I + CM de 60 días; \*  $p < 0.05$  Lx 60 días versus Lx basal y versus I + CM 60 días.

La cantidad de veces que los animales se levantaron tocando con sus dos patas delanteras las paredes del campo se muestra en la tabla 3. En este parámetro que muestra información sobre la actividad motora y la búsqueda de un escape (ansiedad), se observaron algunas diferencias significativas entre los grupos. Los animales lesionados en la prueba basal mostraron los menores valores comparados con los animales intactos y con falsa lesión. A los 60 días del experimento, los animales intactos disminuyeron significativamente este valor ( $F_{(2,15)} = 9.604$ ;  $p=0.0021$ ), al contrario de los animales lesionados que lo aumentaron

significativamente ( $F_{(2,36)} = 4.475$ ;  $p=0.00184$ ). La aplicación de CM induce cambios diferenciales en el número de toques, dependiendo del grupo experimental. En los animales intactos, la estimulación impide la disminución de toques en las paredes.

Finalmente los animales lesionados con CM aumentaron la cantidad de toques en las paredes a los 30 días (diferencia no significativa), aunque posteriormente este valor volvió a disminuir a los 60 días de estimulación, similar al valor que presentaron en la prueba basal.



## TOQUES EN LAS PAREDES

Grupos (n)	Basal	30 días	60 días
I (12)	37.6 ± 3.3	24.0 ± 6.9	12.5 ± 2.1*, **
I + CM (6)	38.8 ± 8.7	36.4 ± 2.7	33.7 ± 4.1
Sham (6)	30.0 ± 16.0	29.0 ± 10.1	28.5 ± 4.5
Sham + CM (6)	33.7 ± 2.7	18.5 ± 3.5	17.0 ± 11.0 *
Lx (14)	19.7 ± 3.2	55.2 ± 16.9	49.9 ± 3.5 *
Lx + CM (14)	19.7 ± 2.9	41.3 ± 19.6*	13.5 ± 3.6

Tabla 3. Número total de toques en las paredes durante los 15 minutos de la prueba en campo abierto. Promedio + DE de cada grupo antes de iniciar la estimulación (basal) y a los 30 y 60 días después de la estimulación diaria con CM. ANOVA de una vía y post hoc Kruskal-Wallis. \* $p < 0.05$  I basal versus I 60 días, Sham + CM basal versus Sham + CM 60 días, Lx basal versus Lx 60 días y Lx + CM basal versus Lx + CM 30 días; \*\* $p < 0.01$  Lx 60 días versus I 60 días y versus Lx + CM 60 días.

### 3.5. Inmunohistoquímica

La figura 4 muestra microfotografías representativas de animales de tres grupos experimentales (intacta, lesionada y lesionada expuesta a CM durante dos meses). Se muestra que ambos grupos lesionados no presentan inmunorreacción a TH en el lado lesionado.

### 4. Discusión

Este estudio muestra que la exposición a campos magnéticos de extrema baja frecuencia aplicados diariamente durante dos meses en un modelo de hemiparkinsonismo en ratas induce algunos cambios conductuales.

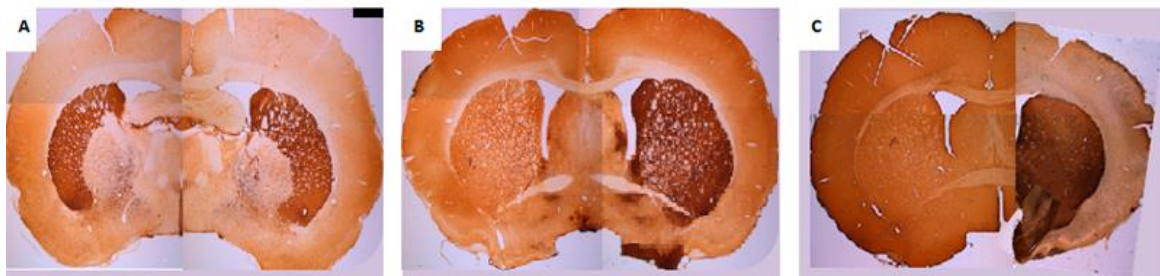


Figura 4. Microfotografías de cortes a nivel de estriado con inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa (TH). A) corte de animal intacto. B) corte representativo de animal con lesión del lado derecho (falta de inmunorreacción) y C) corte de rata con falsa lesión (inyección de solución salina). Barra negra en la figura A corresponde a 1.5mm.

## 4.1. Efectos conductuales

### 4.1.1. Rotaciones inducidas por anfetamina

Con el test de anfetamina se observa un claro aumento en el número de giros a los 60 días en animales lesionados con 6-OHDA, lo que es de esperarse como una actividad ya estereotipada<sup>12</sup> y que nos indica la existencia de una lesión unilateral, lo cual se confirmó con la inmunohistoquímica realizada postmortem, similar a lo documentado por otros autores.<sup>7</sup> Los campos magnéticos provocan que este patrón de aumento en el número de giros inducidos por anfetamina no se presente a los dos meses, sugiriendo que el estímulo magnético retrasa o impide la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, lo cual es necesario confirmar con un estudio detallado de la zona, tal como un conteo neuronal (no realizado en el presente estudio). De confirmarse esta propuesta, apoyaría los resultados previamente reportados por Arias-Carreón y colaboradores.<sup>8</sup> Diversos autores sugieren que la conducta de giro indica los niveles de dopamina en el lado lesionado,<sup>13</sup> lo que podría significar en nuestros resultados, una mejoría en cierta proporción de la lesión en animales estimulados con CM en comparación con los que no recibieron esta estimulación. Otros autores señalan, que la prueba de locomoción inducida por drogas como anfetamina, sirve para relacionar el número de giros ipsilaterales a la lesión, con el tamaño de la misma.<sup>7</sup> Al observar los cortes con el objetivo de 1.5 no distinguimos ninguna diferencia entre los animales lesionados y aquellos que además recibieron estimulación magnética (Figura 4). Cabe mencionar que en el presente estudio no realizamos una evaluación cuantitativa de los cortes con inmunohistoquímica. Queda la incógnita de si los campos magnéticos pueden inducir una disminución en el tamaño de la lesión.

### 4.1.2. Evaluación de la postura

Los giros sobre el eje corporal (“curling”) son una prueba propuesta para medir la conducta asimétrica motora en animales con hemiparkinson, en particular sin ningún estímulo de alguna droga como la anfetamina o apomorfina.<sup>14</sup> En varios estudios se utiliza esta prueba como un buen indicador de inestabilidad postural similar a lo observado en pacientes con EP.<sup>7</sup> En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los giros sobre el eje corporal. Una probable explicación a dicha discrepancia con lo reportado en la literatura, pudiera ser que los resultados han sido alterados por el aprendizaje de las ratas; ya que al realizar la prueba acercaban su cabeza hacia la punta de su cola y en varias ocasiones al hacer esto eran soltadas por el evaluador para evitar ser mordido. Esto pudo crear en ellas un estímulo de condicionamiento, que las llevó a repetir dicho patrón hacia el mismo lado y así lograr que las soltaran.

### 4.1.3. Balance y locomoción

Como la enfermedad de Parkinson es un desorden en gran medida motor, las pruebas conductuales usadas en el modelo animal proveen técnicas útiles para evaluar los déficits en locomoción. En particular, en el modelo de hemiparkinsonismo, al evaluar el tiempo que requiere el animal para recorrer la barra de equilibrio, nos indica un parámetro de la bradicinesia, el balance y la inestabilidad de la postura.<sup>15</sup> En nuestro estudio observamos que el tiempo empleado para atravesar la barra en los animales lesionados con 6-OHDA fue aproximadamente tres veces mayor que en los animales intactos y dos veces mayor, comparado con los animales Sham (Figura 3). Estas observaciones confirman lo previamente reportado para el modelo animal de hemiparkinsonismo<sup>16</sup> y para otros modelos de lesión cortical por isquemia.<sup>17</sup> Además, al transcurrir el experimento, el déficit para atravesar la barra se ve aumentado en los animales lesionados, lo

cual no sucede en los animales con lesión que recibieron durante dos meses campos magnéticos, los cuales muestran al final del experimento valores similares a los basales. Esto apunta, que a pesar de que no disminuye significativamente el tiempo, éste es estadísticamente menor al de los animales con lesión sin estimulación con CM, lo cual representaría una mejoría en el balance y el equilibrio de las ratas estimuladas.

Los resultados obtenidos en la prueba de campo abierto, en la que se evalúa la actividad locomotora y los niveles de ansiedad,<sup>18</sup> muestran cambios inducidos por la exposición a CM. Por un lado, los animales lesionados en la evaluación basal presentaron una locomoción menor que los otros grupos (Tabla 1). Esto sugiere que la pérdida celular dopaminérgica ya está establecida y debido a esto los animales presentan menor locomoción, como ya fue observado en trabajos previos.<sup>8,19</sup> Esta pérdida celular se observó macroscópicamente al final del experimento con la inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa (Figura 4), donde se observa claramente la falta de reacción a TH en el haz nigroestriatal cerebral derecho de los animales lesionados. En pacientes con EP, la dificultad en la locomoción, el equilibrio y la postura son desarrollados cuando la pérdida celular dopaminérgica en la sustancia negra llega a 68%.<sup>7</sup>

La locomoción levemente aumentada en ratas I + CM y Sham + CM a los 30 y 60 días, comparadas con las no expuestas, concuerda con los resultados publicados en otros estudios. La exposición magnética desde el primer día, muestra un aumento en la locomoción espontánea de ratas, efecto que es más notorio en las primeras dos horas de la prueba de campo abierto.<sup>12</sup> Por otro lado, los animales intactos expuestos a CM durante dos meses en nuestro experimento, presentan mayor desplazamiento en el campo abierto que las ratas que no recibieron este estímulo, esto ya había sido reportado por otros investigadores,<sup>21</sup> lo cual sugiere que el CM induce efectos locomotores.

La disminución en el número de toques en las paredes por los animales intactos después de 60 días parece ser contradictoria con los resultados encontrados por otros autores. Después de 7 días de exposición a CM se observó un aumento en el número de toques en los animales expuestos en comparación con los no expuestos.<sup>22</sup> La diferencia entre los resultados encontrados por el equipo de Prolic<sup>22</sup> y nuestros resultados puede deberse a diferencias en los parámetros utilizados (tiempos de exposición, frecuencia e intensidad).

#### **4.2. Diferencias y similitudes del modelo animal empleado en este estudio con la EP en humanos**

En esta enfermedad neurodegenerativa, el número de neuronas y por consiguiente la liberación de DA en la sustancia negra, decaen progresivamente al paso de los años (estado crónico); en concordancia con esto, muchos investigadores han buscado la forma de evitar esta pérdida celular.<sup>3</sup> En el modelo animal utilizado, se ha mostrado en estudios previos que la muerte neuronal en esta área cerebral, es casi inmediata después de la inyección con 6-OHDA (estado agudo); debido a esto, observamos en los animales lesionados pérdida del equilibrio, alteración en la locomoción y pérdida de inmunorreactividad de TH en el haz nigroestriatal cerebral derecho, a una velocidad mucho más rápida que en la enfermedad en humanos, lo cual es progresivo y no súbito como en el modelo animal. A pesar de esto, Troung y colaboradores<sup>7</sup> realizaron un estudio comparativo con tres diferentes dosis de la neurotoxina para representar estadios clínicos de la enfermedad, basados en un conteo de células muertas y diversos parámetros conductuales. Al comparar nuestro trabajo con el de estos autores observamos que la dosis empleada por nosotros corresponde a la menor que ellos utilizaron, la cual fue clasificada en su experimento, como lesión leve o estadio

clínico poco severo de la EP en humanos. Existe evidencia significativa de la mejoría en pruebas de depresión en pacientes con EP, tras la estimulación magnética transcraneal repetitiva prefrontal izquierda.<sup>23</sup>

### **4.3. Posibles aplicaciones en pacientes con EP**

La plasticidad cerebral juega un papel muy importante en los efectos que tienen los CM. Los cerebros de pacientes con daño neurológico como en la enfermedad de Parkinson, reaccionan en forma diferente a la estimulación magnética transcraneal que los voluntarios sanos.<sup>24</sup> Los autores sugieren con estos resultados, que es más fácil demostrar los efectos que los CM tienen en un sistema nervioso dañado.

En el presente experimento encontramos una diferencia significativa en la prueba de barra de equilibrio, entre los animales lesionados y las ratas con hemiparkinson que fueron estimuladas durante dos meses con CM. En este último grupo disminuyó significativamente el tiempo empleado para cruzar la barra, a partir de los 30 días de exposición, lo cual no sucedió en las que no se empleó la terapia electromagnética, que al contrario mostraron deterioro en esta prueba; llegando a impedirles por completo finalizar el test a los 60 días. Es de relevancia recordar que esta prueba mide la capacidad de mantener el equilibrio, lo cual se puede correlacionar con el deterioro progresivo encontrado en los pacientes con enfermedad de Parkinson. Lo anterior pone en evidencia que los CM podrían funcionar como terapia coadyuvante con el tratamiento convencional en la EP, lo cual mejoraría uno de los síntomas más incapacitantes de la enfermedad.

Queda aún por confirmar con experimentos prolongados (tal vez uno o 2 años) el tiempo de duración del efecto benéfico de la terapia magnética en el equilibrio de las ratas hemiparkinsónicas. Además de que con esto, muy probablemente obtengamos resultados significativos en las pruebas de campo

abierto, en las cuales en esta ocasión observamos sólo una tendencia a mejorar la locomoción y reducción de algunos parámetros relacionados con la ansiedad. En estudios anteriores se ha evidenciado que la recuperación en todos los parámetros evaluados de la conducta, ha tomado lugar a la semana 16 post lesión con 6-OHDA.<sup>7</sup> También con nuestros resultados de inmunohistoquímica, es evidente que sería de gran relevancia cuantificar el número de neuronas dopaminérgicas muertas o realizar una relación porcentual de ellas en ratas lesionadas y compararlas con las lesionadas + CM después de un tiempo prolongado de la terapia.

Existen datos en pacientes con EP y tratados con estimulación magnética transcraneal durante 4 meses, los cuales mostraron una disminución significativa en las escalas neuropsiquiátricas.<sup>25</sup> Estos autores sugieren que los efectos benéficos de este tipo de estimulación pudieran actuar inhibiendo al sistema dopaminérgico. Estos resultados nos inclinan a pensar que en el futuro se podrían usar los CM como una terapia neuroprotectora coadyuvante al tratamiento farmacológico, que permitiría a los pacientes con EP, tener una mejor calidad de vida al disminuir y/o postergar la sintomatología, aún más de la que hasta ahora ofrece la terapia convencional.

### **5. Conclusión**

La estimulación diaria con campos magnéticos de extrema baja frecuencia durante dos meses, induce mejoría en el equilibrio y la ansiedad de animales hemiparkinsónicos. Estos resultados nos permiten proponer que los parámetros utilizados de CM en el modelo animal de la EP son adecuados para mejorar algunos síntomas motores de la enfermedad y que podrían ser una alternativa en los pacientes con esta enfermedad.

### **6. Agradecimientos**

Proyecto financiado por PAPIIT IN 217812. Agradecemos a la Sra. Antonia Rojas

Terrazas por su gran ayuda en el mantenimiento y atención de los animales.

## 7. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

## 8. Referencias

1. Repacholi H y Greenebaum B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs, *Bioelectromagnetics* 1999 20: 133–160.
2. Chance WT, Grossman CJ, Newrock R, Bovin G, Yerian K, Schmitt K, Mendenhall C. Effects of electromagnetic fields and gender on neurotransmitters and amino acids in rats, *Physiol Behav* 1995 58: 743–748.
3. Yang Y, Li L, Wang YG, Fei Z, Zhong J, Wei LZ, Long QF, Liu WP. Acute neuroprotective effects of extremely low-frequency electromagnetic fields after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 2012 516: 15–20.
4. Tasset I, Medina FJ, Jimena I, Agüera E, Gascón F, Feijóo M, Sánchez-López F, Luque E, Peña J, Drucker-Colín R, Túnez I. Neuroprotective effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on a Huntington's disease rat model: effects on neurotrophic factors and neuronal density. *Neuroscience* 2012 209:54–63.
5. Keguchi M, Touge T, Nishiyama Y, Takeuchi H, Kuriyama S, Ohkawa M. Effects of successive repetitive transcranial magnetic stimulation on motor performances and brain perfusion in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2003 209: 41–46.
6. Guía de Práctica Clínica, "Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson", inicial y avanzada en el tercer nivel de atención. ([http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/305\\_SSA\\_10\\_PARKINSON\\_3ER\\_NVL/GRR\\_Parkinson.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/305_SSA_10_PARKINSON_3ER_NVL/GRR_Parkinson.pdf)).
7. Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM. Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res* 2006 169:1–9.
8. Arias-Carrión O, Verdugo-Díaz L, Ferial-Velasco A, Millán-Aldaco D, Gutiérrez A, Hernández-Cruz A, Drucker-Colín R. Neurogenesis in the subventricular zone following transcranial magnetic field stimulation and nigrostriatal lesions. *J Neurosci Res* 2004 78:16–28.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, coordinación de investigación Comisión de Ética de la Facultad de Medicina, (2007).
10. George P y Charles W. *The Rat Brain, in stereotaxic coordinates*, Elsevier Academic Press, 5ta ed. San Diego California, USA, 2005 pp. 56.
11. Vázquez-García M, Elías-Viñas D, Reyes-Guerrero G, Domínguez-González A, Verdugo-Díaz L, Guevara-Guzmán R. Exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields improves social recognition in male rats. *Physiol Behav* 2004 82: 685–690.
12. Janać BI, Pesić V, Jelenković A, Vorobyov V, Prolić Z. Different effects of chronic exposure to ELF magnetic field on spontaneous and amphetamine-induced locomotor and stereotypic activities in rats. *Brain Res Bull* 2005 67: 498–503.
13. Schwarting RK y Domenger D. Effects of neostriatal 6-OHDA lesion on

- performance in a rat sequential reaction time task. *Neurosci Lett* 2008 444: 212–216.
14. Borlongan CV y Sanberg PR. Elevated body swing test: a new behavioral parameter for rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism. *J Neurosci* 1995 7: 5372-5378.
  15. Haydn NA y Jasmine MH. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Meth* 2007 159: 195–202.
  16. Warraich ST, Allbutt HN, Billing R, Radford J, Coster MJ, Kassiou M, Henderson JM. Evaluation of behavioural effects of a selective NMDA NR1A/2B receptor antagonist in the unilateral 6-OHDA lesion rat model. *Brain Res Bull* 2009 78: 85–90.
  17. Windle V, Szymanska A, Granter-Button S, White C, Buist R, Peeling J, Corbett D. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-I in the rat. *Exp Neurol* 2006 201: 324–334.
  18. Tongtong L, Sheng W, Lihua H, Kangping Y. Anxiogenic effect of chronic exposure to extremely low frequency magnetic field in adult rats. *Neurosci Lett* 2008 434: 12–17.
  19. Pessoa de Araújo D, Soares De Sousa N, Pontes Araújo PV, Souza Menezes CE, Sousa Rodrigues FT, Souza Escudeiro S, Brito Cortez N, Azevedo Patrocínio MC, Vasconcelos Aguiar LM, Barros Viana GS, Mendes Vasconcelo SM. Behavioral and Neurochemical Effects of Alpha-Lipoic Acid in the Model of Parkinson's Disease Induced by Unilateral Stereotaxic Injection of 6-OHda in Rat. *J Evid Based Complementary and Altern Med*. 2013 ID571378: 1-13.
  20. Pešić V, Janac B, Jelenkovic A, Vorobyov V, Prolic Z. Non-linearity in combined effects of ELF magnetic field and amphetamine on motor activity in rats. *Behav Brain Res* 2004 150: 223–227.
  21. Pešić V, Janac B, Jelenkovic A, Vorobyov V, Prolic Z. Different effects of chronic exposure to ELF magnetic field on spontaneous and amphetamine-induced locomotor and stereotypic activities in rats. *Brain Res Bull* 2005 67: 498–503.
  22. Prolic Z, Janac B, Pešić V, Jelenkovic A. The effect of extremely low-frequency magnetic field on motor activity of rats in the open field. *Ann N Y Acad Sci* 2005 1048: 381-384.
  23. Pal E, Nagy F, Aschermann Z, Balazs E, Kovacs N. The Impact of left prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation on depression in Parkinson's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Mov Disord* 2010 25: 2311–2317.
  24. Boniface S y Ziemann U. Plasticity in the Human Nervous System. Investigations with transcranial magnetic stimulation. Cambridge University Press 2003: 246 – 263
  25. Shimamoto H, Takasaki K, Shigemori M, Imaizumi T, Ayabe M, Shoji H. Therapeutic effect and mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation in Parkinson's disease, *J Neurol* 2001 248:48–52.