SISTEMA PARA LA EVALUACIÓN DE LA MEMORIA PROCEDIMENTAL Y ASIMETRÍA MOTORA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSON EN RATAS

RESUMEN

La presente invención, de acuerdo con las características más relevantes, comprende un sistema para evaluar el síndrome dis-ejecutivo y laterilización en animales hemiparkinsonizados. Se provee un sistema con forma de laberinto, en el cual se evalúa el aprendizaje de un animal, principalmente ratas, antes y después de inducirle una lesión unilateral de la *substantia negra* (LES), empleando la neurotoxina 6 OHDA. Se provee un método para su utilización.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona en forma general con dispositivos para el estudio de síntomas en modelos de roedores, y en forma particular se relaciona con un dispositivo para estudiar síndrome dis-ejecutivo de roedores con enfermedad de Parkinson.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La presente invención concierne en particular a un laberinto para estudiar en forma experimental el síndrome dis-ejecutivo de roedores con enfermedad de Parkinson. (el dispositivo es para evlauar ratas, si se fuera a utilizar en ratones habría que hacer adecuaciones de todas las medidas del sistema)

El documento de modelo de utilidad CN 201315790Y (2009) describe un laberinto rectangular en forma de Y, el cual se emplea para fortalecer la memoria de un animal, en una prueba de reflejo condicionado y aplicando un caso particular para

un ratón. El suelo de dicho laberinto contiene elementos electrónicos para detectar el movimiento del animal, sin embargo el sistema de iluminación se describe como aplicado en los extremos del laberinto, sin una disposición especial y no se menciona la incorporación de ruido blanco. Tampoco se describe la aplicación de la invención para diagnosticar síndromes asociados a la enfermedad de Parkinson, más allá de probar el aprendizaje natural o memoria de un animal.

El documento de solicitud de patente FR 2980667 A1 (2013) describe un laberinto conformado por una multiplicidad de cámaras conectadas entre sí, incorporando medios para permitir la entrada y la salida del animal. Sin embargo, en estas pruebas hay múltiples grados de libertad para el animal de estudio, dado que cada cámara conecta en forma adyacente a 2 o 3 cámaras más. En la parte superior se registra en video el comportamiento cinético del animal y no se hace mención a mecanismos de inducción del movimiento en forma sistemática, como por ejemplo ruido o iluminación. No se menciona si la disposición de elementos sirve para evaluar un síndrome dis-ejecutivo.

Por su parte el documento de solicitud de patente CN 102687676 A (2012) da a conocer un laberinto basado en la identificación de color y un método de experimentación aplicado en roedores. El laberinto basado en el color comprende una plataforma provista de una tablilla transparente para dividir la plataforma, las diferentes entradas se distinguen por el uso de al menos dos colores diferentes. Allí se pueden evaluar ciertos aspectos asociados a la memoria, sin embargo al ser estáticos los colores del laberinto, se podría pensar que los resultados no permiten evaluar diferentes variables asociadas a la asimetría motora, y la memoria procedimental en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson que plantea evaluar la presente invención. Además no se mencionan los impulsos para el proceso de aprendizaje del roedor.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra una vista superior del sistema de la presente invención con su disposición espacial.

Figura 2. Muestra una vista lateral del sistema de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La memoria procedimental corresponde a habilidades y destrezas automatizadas con un fuerte componente motor, y se adquieren a través de la práctica reiterada y también por condicionamiento (Bermeosolo, 2012). El conocimiento de cómo podemos realizar diferentes actividades, tales como conducir un automóvil o hacer un lazo preciso es almacenado como resultado de la experiencia del condicionamiento experimental o memoria procedimental (Arreguín-González, 2013).

El envejecimiento cerebral, las lesiones traumáticas, la demencia frontotemporal y la enfermedad de Parkinson (EP), son eventos y patología que se caracteriza por Sindrome Dis-Ejecutivo (Mujica-Alfonzo, 2010; Kehagia et al., 2013), que se puede resumir en un déficits cognitivos de establecimiento de un patrón de ejecución adecuando que va desde definición de los objetivos a cumplir, la programación o planificación de actividades, secuencias de acciones, autoevaluación, que puede conducir a una repetición constante y automatización o una modificación de decisiones que conlleve a nuevos planes. Estos síntomas están relacionados con la disfunción del lóbulo temporal y son una manifestación del deterioro de la memoria procedimental.

Los modelos experimentales y especialmente en la EP han sido muy útiles, no sólo para entender mejor las patología o eventos neurológicos y sus síntomas, sino que han sido cruciales para el desarrollo de terapias celulares y génicas (Luquin, 2000), sin embargo pocas veces se explora en ellos el deterioro de la memoria

procedimental, en parte porque no hay pruebas suficientes implementadas para su evaluación. El objetivo fundamental la presente invención consistió en crear un dispositivo y un método para evaluar una nueva prueba “Turner Maze” que permitiera evaluar la asimetría motora, y la memoria procedimental en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson, de forma clara, ágil y con parámetros bioéticos.

La presente invención, de acuerdo con las características más relevantes, comprende un sistema para evaluar el síndrome dis-ejecutivo y laterilización en animales hemiparkinsonizados, el cual incluye un primer compartimiento rectangular (1), cerrado, con una puerta de entrada de un solo sentido, una fuente emisora de ondas acústicas en su interior (7), y al menos una fuente emisora de ondas luminosas, y que comprende además dos aberturas de igual área en una de sus caras para la salida del animal.

El invento incorpora un segundo compartimiento rectangular (2) (5), cerrado, con una superficie o pared que lo divide en dos secciones iguales, cada una provista con una fuente emisora de ondas luminosas en el techo para inducir el movimiento del animal, así como una puerta abatible hacia adelante sin retroceso para la entrada (8) (9) y una abertura que comprende una puerta abatible hacia adelante sin retroceso para la salida del animal (10) (11).

Al salir del segundo compartimiento, el invento provee un tercer compartimiento rectangular (3), cerrado, con dos puertas abatibles hacia adelante sin retroceso, que comprende dos aberturas de igual área en una de sus caras para la salida del animal. Por último se incorpora un cuarto compartimiento rectangular (4) (6), cerrado, con una superficie que lo divide en dos secciones iguales, cada una con una puerta abatible hacia adelante sin retroceso (12) (13) para la entrada del animal. En donde los compartimientos están conectados secuencialmente entre sí.

Para efectos de la presente invención, una puerta abatible hacia adelante en una puerta de un solo sentido, de fácil apertura por un animal y la cual se cierra al paso para evitar el retroceso del mismo.

En un aspecto adicional de la presente invención, el primer compartimiento rectangular posee una fuente emisora de ondas acústicas para inducir el paso del animal por el sistema, generando una ello un sonido blanco. Los animales evitan este tipo de sonidos según estudios previos, lo que permite lograr la dinámica del mismo por todo el sistema. Dicho sonido blanco puede lograrse mediante parlantes alámbricos y inalámbricos que emitan las frecuencias características de un sonido blanco.

Para efectos de la presente invención el ruido blanco o sonido blanco es una señal acústica aleatoria que se caracteriza por el hecho de que sus valores de señal en dos tiempos diferentes no guardan correlación estadística.

En otro aspecto de la presente invención, la fuente emisora de ondas luminosas se puede proveer mediante una luz fría generada por diodos emisores de luz o luces LED. Esta forma de iluminación es intensa para los animales, especialmente roedores, e induce en ellos repulsión con movimiento, dado que son animales nocturnos y no le gustan los campos abiertos e iluminados.

En otro aspecto, la presente invención se caracteriza porque la superficie inferior del laberinto está elaborada en un material que permita registrar el movimiento del roedor para estudiar su comportamiento cinético: desplazamiento, velocidad y aceleración durante el paso por el mismo. Para lograrlo se puede proveer un material que permita la visualización del animal, por lo que prefieren polímeros translucidos como el acrílico o cerámicos como el vidrio. Adicionalmente, se pueden emplear otras técnicas como la incorporación de polímeros con memoria de forma o polímeros conductores los cuales cambian sus propiedades mecánicas al paso del animal por el laberinto. Frente a los últimos desarrollos en tecnologías táctiles y para transmitir información en forma inalámbrica, se pueden emplear también

polímeros que incorporan óxido de indio y estaño, óxido de estaño dopado con flúor, óxido de zinc dopado, cerámicos que incorporan piezoeléctricos. Estos permitirían generar gráficos en tiempo real de las pisadas del roedor así como registrar paralelamente el tiempo de cada pisada para correlacionar la velocidad y la aceleración.

En una versión preferida de la presente invención se emplean roedores para evaluar el síndrome dis-ejecutivo y lateralización en animales hemiparkinsonizados, a manera de caso de estudio.

Para efectos de la presente invención, el tiempo de latencia es el tiempo que tarda el roedor en entrar al sistema y llegar al compartimiento meta En la presente invención dicho tiempo no es un valor constante sino un rango de tiempo constante. Para efectos de la presente invención la sustancia nigra se encuentra en el mesencéfalo (entre los pedúnculos cerebrales y el tegmento) y tiene dos zonas. Una zona pálida ventral, la *pars reticulata* (o zona reticular) (SNpr) y una zona pigmentada dorsal, la pars compacta (o zona compacta) (SNpc), que contiene las neuronas dopaminérgicas, cuyos cuerpos celulares contienen la neuromelanina. Este pigmento oscuro, un polímero derivado de la dopamina, es el que da su nombre. La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es un análogo hidroxilado del neurotransmisor dopamina, esta es la neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de enfermedad de Parkinson en roedores, cuando es administrada en el haz nigroestriado induce una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra.

En una versión preferida del invento, el solvente orgánico empleado para la limpieza del sistema es alcohol etílico en solución acuosa.

Ejemplo de realización

Resumen

Para la evaluación de la presente invención se realizó la construcción un laberinto como el descrito previamente, con las siguientes dimensiones: largo de 125 cm, ancho de 12 cm y alto de 6 cm. La longitud de paso en el primer compartimiento fue de 25 cm, en el segundo de 50 cm, para el tercer y cuarto de 25 cm cada uno. Para la evaluación del laberinto se utilizaron 15 animales, los que fueron entrenados en el laberinto durante 5 días hasta alcanzar el criterio de aprendizaje (Fase De Adquisición). Después del entrenamiento de adquisición los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos: 5 animales para controles intactos (INT) y 10 animales con lesión unilateral de la *sustancia nigra* (LES), inducido con la neurotoxina 6 OHDA (específica para catecolaminas). Quince días después de la lesión los animales fueron evaluados nuevamente utilizando el mismo paradigma experimental (Fase Reiteración) donde se validó que el laberinto diseñado tiene la capacidad de evaluar el síndrome dis-ejecutivo y laterilización, en animales hemiparkinsonizados.

Metodología empleada

Para materializar la presente invención se elaboró una caja en forma rectangular de acrílico transparente (parte visible, paredes, divisor simétrico y techo), blanco (piso) y negro (meta, caja final con división simétrica), que tuvo las siguientes medidas: 1,25 metros de largo x 13 cm de ancho.

<u>Compartimiento 1</u> (*aversión auditiva y selección de lateralidad*): el compartimiento (1), según la Figura 1, mide 25 cm de largo por 13 de ancho, presenta una puerta de guillotina central de 3 x 3 cm y un Parlante (7) Bluetooth Manos Libres Portatil V 3.0 Mp3 Micro Sd, de 7.4x 5.9 cm en el techo del compartimiento, que transmite un sonido blanco (densidad espectral de potencia, PSD por sus siglas en inglés), el cual es constante y se inicia con la entrada de la rata al compartimiento. El

compartimiento fue provisto con dos hilera de luz LED - Luz Fría 6000ºK 18W (una en cada pasillo, adheridas en techo de forma equidistantes), las cuales se mantienen encendidas de forma constante durante el ensayo.

Compartimiento 2 (*exploración*): Terminando el primer compartimiento (1) hay una pared acrílica transparente fijada de forma simétrica que divide el siguiente compartimiento en dos pasillos similares (2) y (5), de 6 cm de ancho cada uno, este compartimiento tiene un largo de 50 cm y un ancho de 13 cm. El compartimiento 2 termina con dos puertas abatibles hacia delante sin retroceso. Presenta también dos hilera de luz LED-Luz Fría 6000ºK 18W, adheridas en el techo de forma equidistantes, en centro de cada pasillo.

Compartimiento 3 (*selección*): Se construyó un tercer compartimiento (3), similar en dimensiones al Compartimiento 1, el cual tiene entradas compuestas por sendas puertas abatibles, Se dispusieron dos hilera de luz LED -Luz Fría 6000ºK 18W (una en cada pasillo, adheridas en techo de forma equidistantes).

Compartimiento 4 (*meta*): Compartimiento oscuro de acrílico negro, presenta dos puertas abatibles, sin retroceso y mide, 25 cm de largo y 13 cm de ancho, al igual que en el Compartimiento 2 hay una pared acrílica, en este caso negra, fijada de forma simétrica que divide el siguiente compartimiento en dos pasillos similares de 6 cm de ancho cada uno. Presenta también las dos hileras de luz LED -Luz Fría 6000ºK 18W (una en cada pasillo, adheridas en techo de forma equidistantes). Este compartimiento presenta sensores de movimiento que si la selección ha sido la correcta interrumpirán la trasmisión de sonido y la luz. Cada puerta abatible presentará diferentes figuras y colores (esto será cambiante y se adaptará al paradigma de acuerdo al diseño experimental).

Procedimiento

El objetivo del procedimiento consiste en evaluar la memoria procedimental en ratas hemiparkinsonizadas.

El entrenamiento en el Laberinto de Turner, se realiza en la habitación “negra”, que es oscura, sin señales extralaberínticas, exceptuando el investigador, que siempre permanecerá en la misma posición durante la prueba.

El animal se somete a un proceso de entrenamiento que se denominará para efectos de esta invención *ADQUISICIÓN*. El criterio de aprendizaje, lo darán la latencia de escape, definido como el tiempo que se demora el roedor en llegar a la meta; el número de aciertos (80% de selección del sub-compartimiento de escape); y la lateralización, definido como la selección de pasillo derecho o izquierdo. Cuando la curva de latencia de escape, describa una curva asintótica y se mantenga el 80% de aciertos, se considerará criterio de aprendizaje.

Para efectos de la presente invención se define como *REITERACIÓN* a la repetición del proceso después del estímulo aplicado en el diseño experimental, en ese caso después de la lesión unilateral de 6OHDA en la sustancia nigra, para inducir el modelo de rata hemiparkinsonizada. Se repetirá el mismo paradigma de la adquisición y se evaluarán los mismos parámetros.

El estimado de la prueba en este paradigma experimental es de 3 a 5 días con 8 a 10 ensayos diarios por animal.

REIVINDICACIONES

1) Un sistema para evaluar el síndrome dis-ejecutivo y laterilización en animales hemiparkinsonizados, caracterizado porque comprende:
   a) Un primer compartimiento rectangular (1), cerrado, con una puerta de entrada de un solo sentido, una fuente emisora de ondas acústicas en su interior (7), y al menos una fuente emisora de ondas luminosas, y que comprende además dos aberturas de igual área en una de sus caras (2) (5) para la salida del animal;
   b) Un segundo compartimiento rectangular, cerrado, con una superficie que lo divide en dos secciones iguales (2) (5), cada una provista con una fuente emisora de ondas luminosas en el techo, una puerta abatible hacia adelante sin retroceso para la entrada (8) (9) y una abertura que comprende una puerta abatible hacia adelante sin retroceso para la salida del animal (10) (11);
   c) Un tercer compartimiento rectangular (3), cerrado, con dos puertas abatible hacia adelante sin retroceso, que comprende dos aberturas de igual área en una de sus caras para la salida del animal (12) (13);
   d) Un cuarto compartimiento rectangular, cerrado, con una superficie que lo divide en dos secciones iguales (4) (6), cada una con una puerta abatible hacia adelante sin retroceso para la entrada del animal (12) (13);

   En donde los compartimientos están conectados secuencialmente entre sí.

2) El sistema de la reivindicación 1, donde en el primer compartimiento rectangular la fuente emisora de ondas acústicas (7) produce un sonido blanco y se selecciona del grupo que comprende: parlantes alámbricos y parlantes inalámbricos.
3) El sistema de la reivindicación 1, donde la fuente emisora de ondas luminosas comprende una luz fría generada por diodos emisores de luz.
4) El sistema según la reivindicación 1, caracterizado porque la superficie inferior está elaborada de un material que se selecciona de grupo que comprende: polímeros translucidos, polímeros con memoria de forma, polímeros

conductores, polímeros que incorporan óxido de indio y estaño, óxido de estaño dopado con flúor, óxido de zinc dopado, cerámicos que incorporan piezoeléctricos.

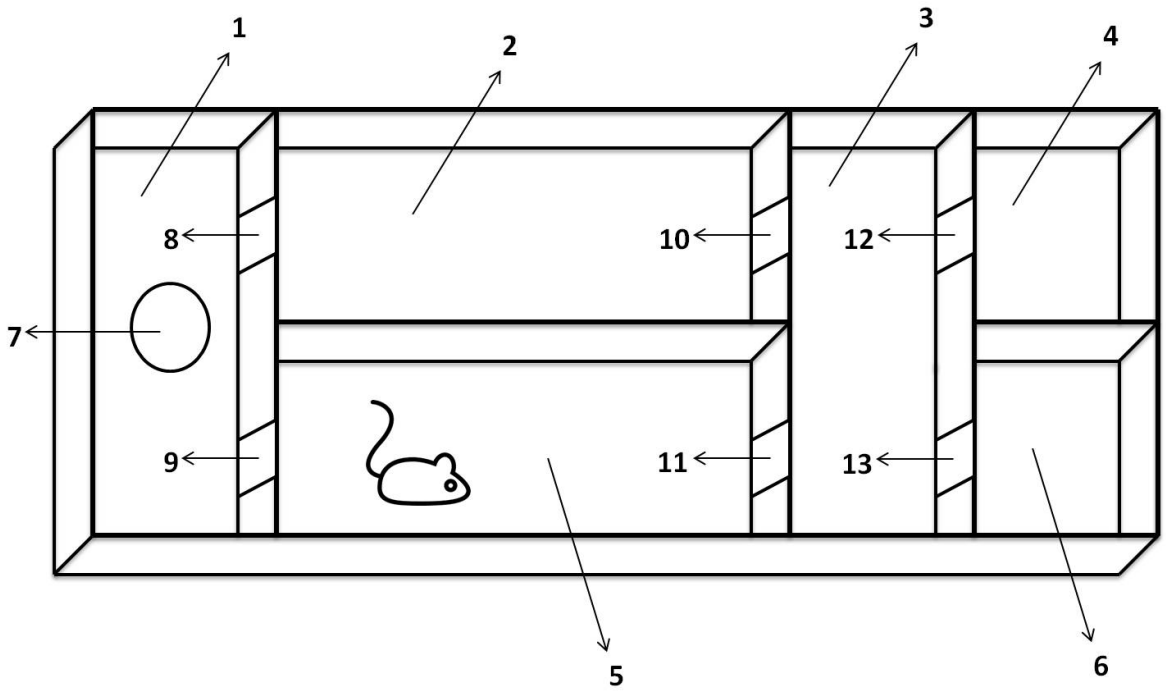

Figura 1

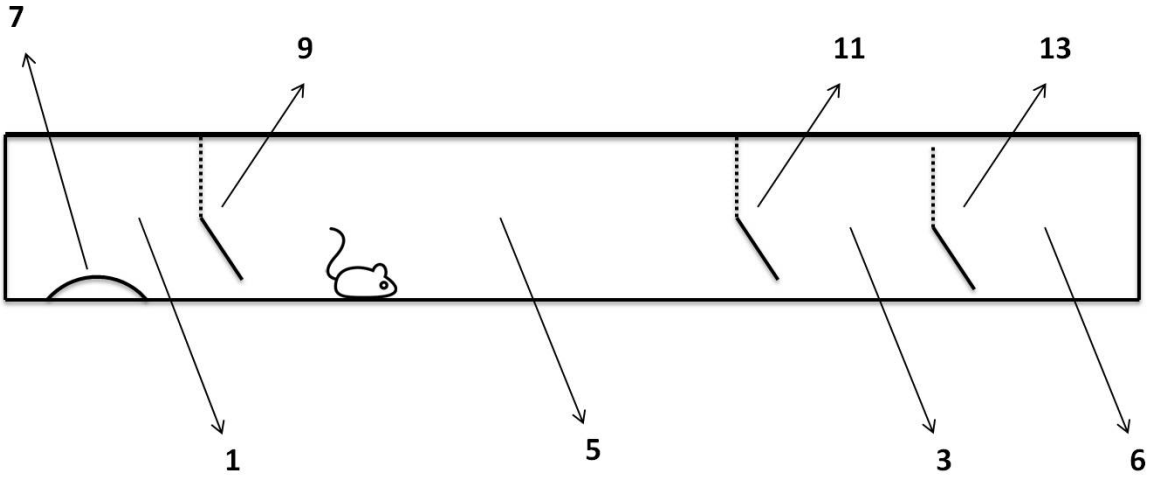

Figura 2

RESPUESTA AL EXAMEN DE FONDO

1. Respecto a las reivindicaciones

Se realizaron las debidas correcciones a la forma de redacción de las reivindicaciones según el oficio No. 4678, así:

Reivindicación 2: El sistema de la reivindicación 1, donde en el primer compartimiento rectangular la fuente emisora de ondas acústicas (7) produce un sonido blanco y se selecciona del grupo que comprende: parlantes alámbricos y parlantes inalámbricos.

Reivindicación 3: El sistema de la reivindicación 1, donde la fuente emisora de ondas luminosas comprende una luz fría generada por diodos emisores de luz.