



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Psicología

División de Estudios Profesionales

“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE NICOTINA EN
LA EXPRESIÓN DE C-FOS EN LOS GANGLIOS BASALES EN UN
MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA

ALEJANDRA BORONAT GARCÍA

DIRECTOR: DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO

REVISOR: DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

SINODALES: DR. RENÉ DRUCKER COLÍN
DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO
LIC. OLGA ARACELI ROJAS RAMOS



México, D.F. 2013

DEDICATORIA

Agradezco a aquellas personas que tuvieron la paciencia de estar conmigo a lo largo de este proceso. Cada uno de ellos aportando diversas enseñanzas para lograr finalizar este proyecto.

Le dedico este trabajo a mis padres, quienes me han apoyado incondicionalmente durante toda mi vida. Quienes me han hecho la persona que soy, quienes me inculcaron el gusto por saber cómo funcionan las cosas. Sin su apoyo y enseñanzas no hubiera aprendido de mis errores, por lo que a ellos les dedico esta tesis, por hacer que me levante después de cada caída.

A mi familia, a mi hermano Pedro, a mis primos (Arianda, Roc, Juan y Mari Fer), a mis tíos (Paca y Juan, Roque y Magda, Rodolfo, Leticia), abuelos, a mi sobrinos Krish y próximamente María. Quienes siempre han estado a mi lado, apoyándome en cada paso que doy. A cada uno tengo que agradecerle y dedicarle este trabajo, pues el llegar aquí no ha sido un trabajo individual.

A las mushashas: Julia M, Sofia, Fer, Ximena y Julia C, a quienes adoro y desde hace ya muchos años han sido parte de mí, de mi vida diaria y cuyo cariño es incondicional. Hemos compartido y crecido juntas, les agradezco por su amistad, cariño y risas que han hecho la vida mucho más sencilla y divertida.

A mis compañeros de la facultad Daniel, Mafi, Valeria, Vida, Tania, Ana, Ana E, y Angélica, amigos muy queridos que hicieron de la facultad un lugar en el que me gustaba estar y pasar los descansos tomando café con sus pláticas y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Comenzare con agradecer a la Dra. Magdalena Guerra Crespo quien fungió como mi tutor principal. Asimismo, al Dr. René Drucker Colín, quien estuvo presente a lo largo de este proceso.

A la casa magna de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, sede de grandes investigaciones, conocimiento y enseñanzas. A la Facultad de Psicología, que me

dio un espacio dentro de sus aulas. Y finalmente al Instituto de Fisiología Celular, donde se realizaron los experimentos de este trabajo.

Parte fundamental en la realización de la tesis, fue sin duda alguna, las pláticas y discusiones que tenían lugar por las mañanas con un café en mano, junto con el casi Dr. José Rubén García Montes (Dr. Mimol), quien sin su ayuda, comentarios y apoyo, no hubiera sido posible la realización de la tesis. Gracias por aguantarme estos años, sentada junto a ti molestándote todo el tiempo, te dedico esta tesis con mucho cariño y recuerda que en mí tienes a una gran amiga y colaboradora.

Agradezco a los técnicos del laboratorio, Diana Millán y Marcela Palomero, por soportarme todos los días, mis exigencias y muchas veces caprichos. Por no arrancarme la cabeza, y brindarme su amistad sincera.

Agradezco al Sr. Lino, quien siempre está al pendiente de mantener todo en orden para que podamos hacer experimentos. Su paciencia y sabiduría son una gran enseñanza para todos.

Agradezco a Francisco Pérez Eugenio, del departamento de cómputo, por todo su apoyo técnico así como su amistad.

Agradezco a todos mis compañeros y ex-compañeros del laboratorio (Ana, Fernanda, Khalil, Lalo, Lupis, Mafí, Mónica, Omar y Beto) por hacerlo todo más divertido.

Agradezco a Olga Rojas, mi profesora de la carrera, que gracias a sus enseñanzas en los primeros semestres fue que elegí tomar este camino, pues logró despertar mi interés sobre el conocimiento y las bases fisiológicas de la conducta.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
GLOSARIO	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES	9
1.1 ANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES	9
1.2 TIPOS NEURONALES EN EL ESTRIADO	13
1.2.1 NEURONAS ESPINOSAS MEDIANAS (NEMS)	13
1.2.2 INTERNEURONAS ESTRIATALES	14
1.3 VÍAS DEL MOVIMIENTO EN LOS GB: VÍA DIRECTA E INDIRECTA	16
1.3.1 ¿CUÁL ES LA RELACIÓN DE LA DOPAMINA Y LA ACTIVIDAD DE LAS NEMS?	18
1.3.2 CONTROVERSIAS DEL MODELO TRADICIONAL DE LOS GB	19
1.4 LESIONES EN LOS CIRCUITOS DE LOS GB	22
1.5 MICROCIRCUITO GABAÉRGICO EN EL ESTRIADO	24
1.5.1 CIRCUITO CORTICO-ESTRIAL	24
1.5.2 CIRCUITO CORTICO-ESTRIAL DE TIPO FEEDFORWARD Y FEEDBACK	25
1.6.1 IMPORTANCIA DE LOS NACHR Y LA NICOTINA EN LOS GB	28
1.6.2 ¿CUÁL ES LA FUNCIÓN DE LA ACETILCOLINA EN EL ESTRIADO?	30
1.7 MODELOS ANIMALES DE LA EP	33
1.8 TRATAMIENTO DE LA EP	36
1.9 TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS DISTINTAS ALTERACIONES OBSERVADAS EN EL MODELO DE EP	38
1.9.1 TÉCNICAS CONDUCTUALES	38
1.9.2 GENES DE EXPRESIÓN TEMPRANA	39
1.9.3 C-FOS Y SU RELACIÓN CON ACTIVIDAD NEURONAL	40
CAPÍTULO 2: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
2.1 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
2.2 OBJETIVO GENERAL	42
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES	43
2.4 HIPÓTESIS GENERAL	43
2.5 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	43
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	44
3.1 ANIMALES	44
3.2 PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE NICOTINA	46
3.4 CONDUCTA DE GIRO INDUCIDA CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS	47
3.5 PERFUSIÓN TRANSCARDIACA	48
3.6 HISTOLOGÍA	49

3.7 CONTEOS CELULARES	51
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
C A P I T U L O 4: RESULTADOS	53
4.1 EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE NICOTINA	53
4.2 ASIMETRÍA MOTORA INDUCIDA CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS	53
4.2.1 ANFETAMINA	53
4.2.2 APOMORFINA	55
4.3 EVALUACIÓN DE LA LESIÓN EN EL ESTRIADO Y EN LA SNC.	57
4.4 ACTIVACIÓN DE c-Fos EN EL ESTRIADO DORSAL	58
4.4.1 ANFETAMINA	58
4.4.2 APOMORFINA	61
4.3 ACTIVACIÓN DE c-Fos EN POBLACIONES ESTRIATALES ESPECÍFICAS.	65
C A P I T U L O 5: DISCUSIÓN	69
5.1 BASES CELULARES DE LA CONDUCTA DE GIRO	69
5.1.1 CONDUCTA MOTORA Y ACTIVIDAD NEURONAL ASOCIADAS A LA DISMINUCIÓN DE DOPAMINA EN EL ESTRIADO	69
5.1.2 CONDUCTA MOTORA Y ACTIVIDAD NEURONAL ASOCIADOS A LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE NICOTINA EN LA EP	71
5.2 MICROCIRCUITERIA DEL ESTRIADO	72
5.2.1 CAMBIOS EN LA MODULACIÓN DE ENTRADA Y SALIDA: INTERNEURONAS EN EL ESTRIADO	73
5.2.2 LA SALIDA DE LA INFORMACIÓN DENTRO DEL ESTRIADO: NEMs DE LA VÍA DIRECTA	75
C A P I T U L O 6: CONCLUSIÓN	77
R E F E R E N C I A S	79

G L O S A R I O

ACh	Acetilcolina
AMPC	Adenosín monofostafo cíclico
AVT	Area ventral tegmental
Ca²⁺	Calcio
DAG	Diacilglicerol
DAT	Transportador de dopamina
EP	Enfermedad de Parkinson
FS	Interneuronas de disparo rápido (<i>Fast spiking</i>)
GB	Ganglios basales
Ge	Proteína G estimuladora
GP externo/interno	Globo Pálido externo o interno
Gi	Proteína G inhibitoria
K⁺	Potasio
LTS	Interneurona de bajo umbral de disparo (<i>Low threshold spiking</i>)
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina
MAO	Monoamino oxidasa
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MR	Receptores muscarínicos colinérgicos
Na²⁺	Sodio
nAChR	Receptores nicotínicos colinérgicos

NAT	Transportador de noradrenalina
NEMs	Neuronas espinosas medianas
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ONS	Oxido nítrico sintetasa
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
SN	Sustancia <i>nigra</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SNc	Sustancia <i>nigra pars compacta</i>
SNr	Sustancia <i>nigra pars reticulata</i>

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa cuyos síntomas principales son temblor distal en reposo, bradiscinecia, pérdida de los reflejos posturales y rigidez muscular. Estas alteraciones son resultado de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars* compacta (SNc) lo que disminuye la entrada dopaminérgica hacia el estriado. Basado en estudios epidemiológicos, donde se observa que los fumadores tienen menor incidencia de presentar la EP, se ha sugerido que la nicotina puede tener efectos neuroprotectores. En el circuito de los ganglios basales, incluyendo la SNc y el estriado, los receptores nicotínicos interactúan funcionalmente con receptores dopaminérgicos. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar los efectos de la administración crónica de nicotina sobre la actividad de las neuronas estriatales, que puedan relacionarse con los cambios observados en la conducta de giro inducida con agonistas dopaminérgicos, en el modelo en rata de 6-OHDA. Los animales consumieron nicotina mediante un protocolo de autoadministración durante 66 días previo a la lesión con 6-OHDA, comenzando a los 21 días de edad. Para observar los cambios asociados con la administración crónica de nicotina en las neuronas del estriado, se utilizó doble inmunofluorescencia contra c-Fos y 3 marcadores específicos de diferentes neuronas estriatales. La administración crónica de nicotina no tuvo ningún efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNc. La administración de apomorfina, agonista de receptores dopaminérgicos, incrementó en un 18% la expresión de c-Fos en el estriado del lado lesionado de los animales sin tratamiento de nicotina, y en un 25% en los animales tratados con nicotina. La expresión de c-Fos fue observada en interneuronas de disparo rápido y de bajo umbral de disparo, así como en las neuronas de proyección de la vía directa. Asimismo, se observó un incremento en la conducta de giro, propia del modelo unilateral de 6-OHDA de la EP, inducida mediante la administración de apomorfina. Los datos sugieren que la administración crónica de nicotina induce cambios en la actividad neuronal dentro del estriado, probablemente por un incremento de la afinidad de los receptores dopaminérgicos, que puede contrarrestar las alteraciones motoras tras la pérdida de dopamina dentro de esta estructura, más que tener un efecto neuroprotector que prevenga la EP.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Parkinson (EP), descrita por primera vez en 1817 en el documento “*An Essay of the Shaking Palsy*” por James Parkinson, afecta al 1-3% de la población mayor de 60 años (Harris *et al.*, 2009). La Organización Mundial de la Salud, basada en la predicción realizada por Dorsey y colaboradores (2007), sugiere que para el año 2030 debido al aumento en la esperanza de vida, el número de personas con dicha enfermedad se duplicará en los países con mayor población.

Los criterios de diagnóstico clínico de la EP están englobados en síntomas no motores y motores (Chaudhuri *et al.*, 2005), siendo éstos últimos los que caracterizan la tétrada clásica de la enfermedad (temblor distal en reposo, bradicinesia, rigidez muscular y pérdida de los reflejos posturales).

Los síntomas no motores de la EP incluyen depresión, trastornos de la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y alteraciones del olfato. Éste último, se presenta con frecuencia y es considerada un síntoma temprano de la enfermedad caracterizado por un déficit en la detección, identificación y discriminación de olores (Tissingh *et al.*, 2001; Bohnen *et al.*, 2007).

A nivel microestructural, la EP se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas que origina un desbalance en los mecanismos encargados de regular el control y coordinación del movimiento, tono muscular y postura (Bernheimer *et al.*, 1973; Toulouse y Sullivan, 2008). La principal zona afectada es la sustancia *nigra pars compacta* (SNc), la cual posee somas de neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el cuerpo estriado (núcleo caudado y núcleo putámen), el cual, junto con el globo pálido (GP) y el núcleo subtalámico conforman lo que se conoce como ganglios basales (GB). La función de los GB es el control del movimiento voluntario e involuntario (Bernheimer *et al.*, 1973; Drucker-Colín y Anías Calderón, 2005; Toulouse y Sullivan, 2008).

La dopamina liberada por las neuronas dopaminérgicas de la SNc juega un papel modulador dentro de la circuitería de los GB (Drucker-Colín y Anías-Calderón, 2005); el estudio de este circuito es de suma importancia para entender tanto el control de los movimientos como las patologías que involucran su alteración (por ejemplo EP y enfermedad de Huntington).

Hasta ahora, los tratamientos existentes para la EP no han sido exitosos en un contexto curativo; únicamente han mostrado ser eficaces para la desaparición transitoria de algunos de los síntomas, principalmente los motores. El tratamiento más utilizado, desarrollado en el siglo XX, implica la administración oral de levodopa (L-DOPA) que es un precursor dopaminérgico, el cual es transformado a dopamina en el cerebro. Desafortunadamente, con el progreso de la enfermedad, sus efectos disminuyen y eventualmente, desaparece la mejoría en la sintomatología motora.

Por otro lado, existen estudios recientes que señalan a la nicotina, un alcaloide agonista de receptores colinérgicos nicotínicos, como un posible candidato para el tratamiento de la EP. Se ha determinado que la nicotina tiene un papel neuroprotector contra daños químicos en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* de la EP (O'Neil *et al.*, 2002; Donnelly-Roberts *et al.*, 1996; Dajas-Bailador *et al.*, 2000; Ferchmin *et al.*, 2003; Prendegast *et al.*, 2001). Asimismo, estudios epidemiológicos han mostrado que existe una menor incidencia de EP en fumadores (Morens *et al.*, 1995; Baron *et al.*, 1996; Gorell *et al.*, 1999; Quik *et al.*, 2004). Por lo anterior, el estudio de los efectos que posee la nicotina en los GB se ha convertido en una importante línea de investigación, pues aun no se ha esclarecido el papel que juega en el control de los movimientos asociados a este conjunto de núcleos.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar a nivel conductual y celular, los efectos de la administración crónica de nicotina en el estriado, en un modelo animal de la EP. A nivel celular nos enfocamos en evaluar la expresión de c-Fos, un gen de activación temprana cuya expresión puede ser inducida bajo ciertos estímulos y que es utilizado como un marcador de actividad neuronal.

Nuestra estrategia experimental consistió en la administración crónica de nicotina vía oral (VO), iniciando en etapa posnatal (3 semanas de edad). Posteriormente, se llevó a cabo la lesión del sistema dopaminérgico nigro-estriatal en uno de los hemisferios cerebrales (ratas hemiparkinsonianas¹), durante la etapa adulta (12 semanas de edad). Subsecuente a la desnervación dopaminérgica, se inyectaron dos agonistas dopaminérgicos, los cuales nos permitieron evaluar los efectos de la administración crónica de nicotina sobre la conducta motora y la desnervación dopaminérgica.

Nuestros resultados indican que en los animales hemiparkinsonianos tratados con nicotina, la asimetría motora se ve modificada. Al inyectar anfetamina hay una tendencia a reducir la asimetría motora, mientras que al inyectar apomorfina hay un incremento significativo de ésta. De manera interesante, el incremento observado en el caso de la apomorfina correlaciona con una mayor expresión de c-Fos en el hemisferio lesionado. Además, se determinó que estos cambios en la expresión de c-Fos se presentan en tipos celulares específicos dentro del estriado, tales como interneuronas GABAérgicas y neuronas de proyección. En los animales no lesionados pero tratados con nicotina, se pudo observar un incremento significativo en la expresión de c-Fos en ambos hemisferios, inducida mediante la inyección de apomorfina, además de cambios en la activación de diversos tipos celulares del estriado (*vs* animales no lesionados sin tratamiento de nicotina).

Este trabajo muestra por primera vez que la administración crónica de nicotina induce cambios en la actividad neuronal de distintos tipos celulares, principalmente de interneuronas estriatales, lo cual tiene efectos sobre la conducta motora. Asimismo, dichos cambios son potenciados cuando la dopamina estriatal se encuentra disminuida, como en la EP.

¹ En el modelo de 6-OHDA de la EP, la neurotoxina es inyectada en la SNc de un hemisferio cerebral, manteniendo al otro hemisferio intacto.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1.1 ANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES

Los Ganglios Basales (GB) son un conjunto de núcleos interconectados localizados en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo. Se pueden dividir funcionalmente en núcleos de entrada, núcleos de relevo y núcleos de salida (Figura 1). Los núcleos de entrada son el estriado (núcleo caudado y putámen) y el núcleo *accumbens*; los núcleos de relevo incluyen al subtálamo, al globo pálido externo (GP externo), a la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) y al área ventral tegmental (AVT); mientras que los núcleos de salida son el GP interno (núcleo entopeduncular en especies no primates) y la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) (Figura 1).

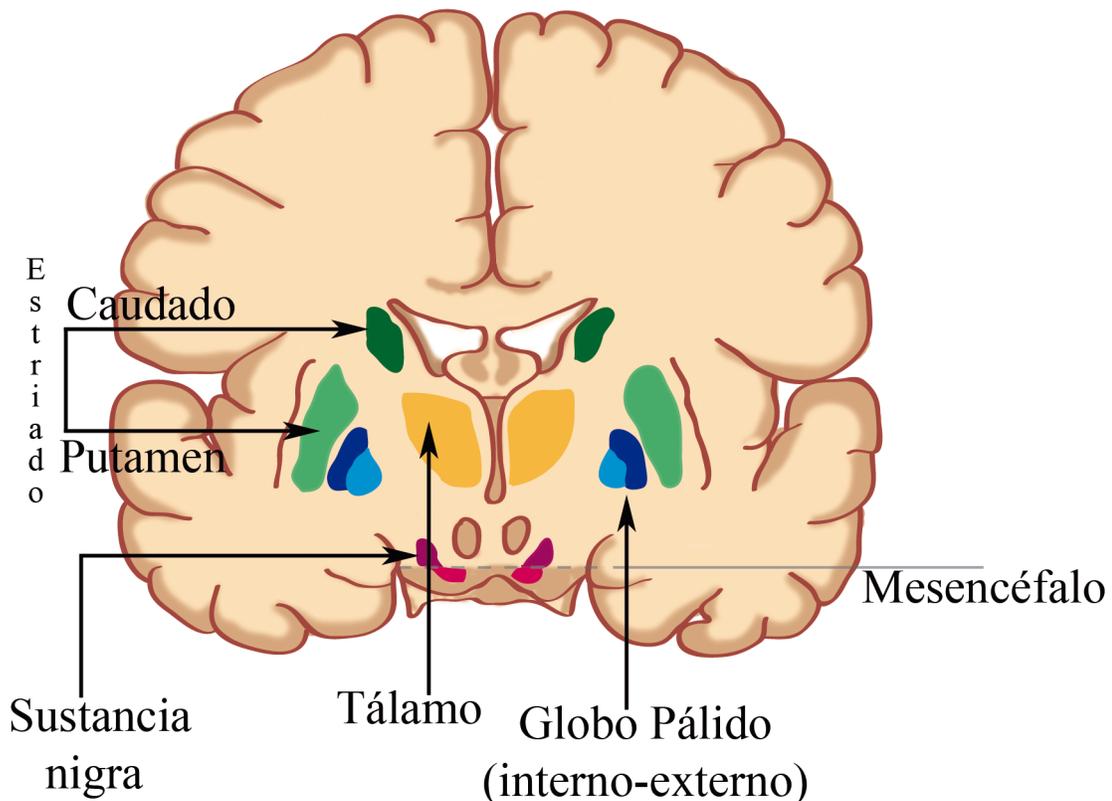


Figura 1. Estructuras que integran los ganglios basales en el cerebro humano. La mayoría de los componentes de los GB se encuentran en el telencéfalo. La sustancia nigra (SN) se encuentra en el mesencéfalo y el núcleo subtálamico en el diencefalo (no señalada en la figura). Las proyecciones de la SN llegan al estriado en animales no humanos o al núcleo caudado y putámen en humanos.

Anatómicamente y de acuerdo con la localización y función de los núcleos que lo integran, los GB se dividen en una región dorsal y otra ventral. La división ventral se relaciona con funciones límbicas y consiste del núcleo *accumbens*, el GP ventral (que puede incluir la región ventral del GP interno), las regiones mediales del núcleo subtalámico y SN, así como al AVT. La región dorsal se asocia a funciones motoras y asociativas, se compone del estriado (caudado y putámen en humanos), GP interno y externo, la SNr, SNc, y el núcleo subtalámico (Tepper *et al.*, 2007).

En términos funcionales, el estriado es la principal estructura de entrada de los GB. Éste posee tres núcleos de entrada muy similares en su estructura interna: núcleo *caudado*, núcleo putámen y núcleo *accumbens*. Hacia el núcleo *caudado* y putámen proyectan fibras glutamatérgicas desde la corteza cerebral y tálamo; dopaminérgicas desde la SNc y serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafé (Figura 2). Hacia el núcleo *accumbens* proyectan fibras desde la corteza límbica, hipocampo y fibras dopaminérgicas desde el AVT (Wilson, 2004).

Las salidas del estriado son principalmente hacia el GP externo, el GP interno y la SNr. Estos dos últimos son los núcleos de salida de los GB y cuyas estructuras diana son principalmente el tálamo y en menor medida el núcleo lateral habenular y capas profundas del colículo superior (Wilson, 2004) (Figura 1 y 2).

El GP se divide anatómicamente en dos regiones; una región lateral llamada GP externo y una región medial llamada GP interno. Ambas divisiones utilizan GABA como neurotransmisor. El GP externo proyecta principalmente hacia el núcleo subtalámico, mientras que el GP interno lo hace hacia el tálamo (núcleos ventral lateral, posterolateral y centromediano), núcleo subtalámico, SNr, y a los núcleos de la formación reticular mesencefálica (Figura 2).

Por otra parte, el GP externo y el interno reciben principalmente aferencias GABAérgicas desde el estriado, mientras que el GP interno recibe, además, entradas glutamatérgicas del núcleo subtalámico y dopaminérgicas desde la SNc (Figura 2).

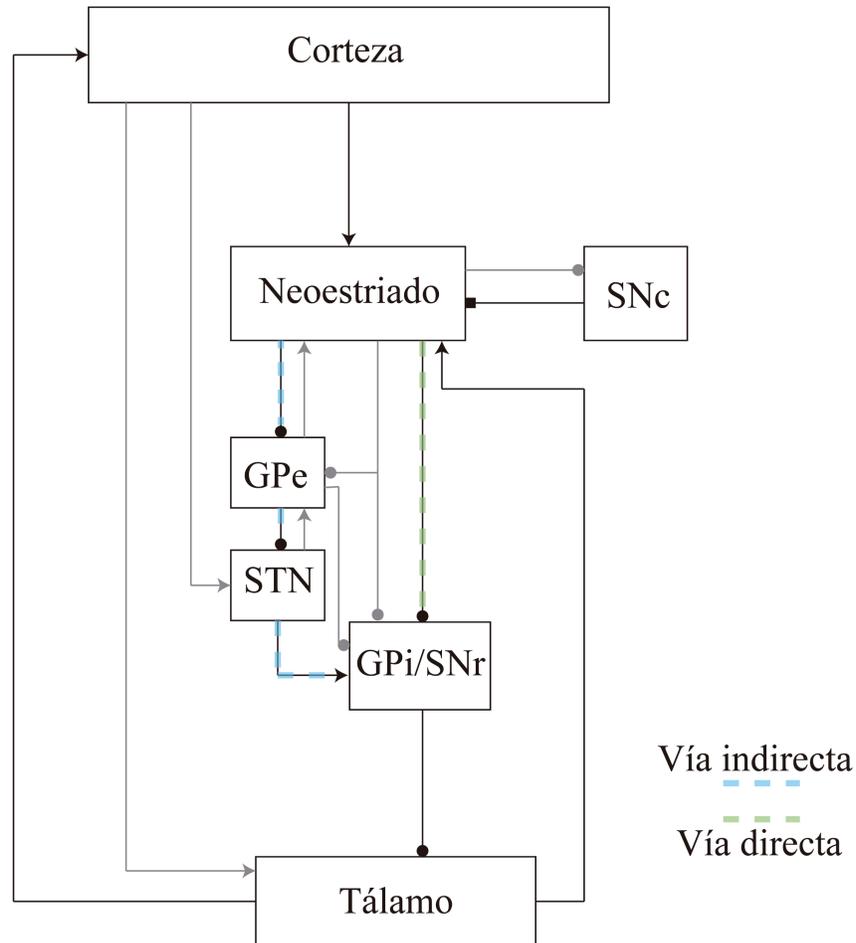


Figura 2. Diagrama simplificado de la macrocircuitería dentro de los GB. En negro se muestra el modelo inicial propuesto por Albin (1989) y DeLong (1990), para explicar el funcionamiento de los GB. En gris se muestran las modificaciones actuales. Las sinapsis glutamatérgicas (excitatorias) están representadas con flechas, las sinapsis GABAérgicas (inhibitorias) con círculos y las dopaminérgicas con un cuadro. Tomado y modificada de Tecuapetla-Aguilar, 2007.

El núcleo subtalámico se localiza en el diencefalo. Tiene una cercana interacción con todos los núcleos de los GB, lo que le permite participar en el control del procesamiento y transferencia de información dentro de los GB, así como en el relevo para las aferencias

corticales. Recibe aferencias de diversas estructuras, incluyendo aquellas glutamatérgicas que provienen de regiones frontales de la corteza, GABAérgicas del GP externo y tálamo, dopaminérgicas desde la SNc, entre otras. Las aferencias que proceden desde el núcleo subtalámico son glutamatérgicas, principalmente dirigidas hacia el GP interno y a la SNr, así como al estriado y al núcleo *pedunculopontino* tegmental.

La SN está compuesta por dos regiones, la SNc y la SNr. Sus aferencias consisten de fibras GABAérgicas de neuronas estriatales que co-expresan sustancia P (ver más adelante). También recibe aferencias del GP y de los núcleos del raqué en el tronco encefálico.

La SNr proyecta fibras GABAérgicas hacia el tálamo, a la región tegmental de la formación reticular y a los colículos superiores. La SNc junto con el AVT establecen las conexiones dopaminérgicas del estriado, núcleo subtalámico y GP. La SNc y el AVT reciben aferencias desde muchas áreas, tales como el estriado, el cual proyecta fibras GABAérgicas junto con el GP. La dopamina de la SN parece jugar un papel importante en la regulación de la entrada inhibitoria desde la SNr, también modula la tasa de disparo neuronal así como la liberación de dopamina, además de modular las salidas del estriado, lo cual es crucial para la conducta motora. Este tema se abordara con más detalle en otra sección.

A esta región también proyecta una prominente inervación glutamatérgica, proveniente de fibras del núcleo subtalámico. Todas las clases de receptores glutamatérgicos están presentes en la SNr (Albin *et al.*, 1989). La SN también recibe aferencias serotoninérgicas desde los núcleos dorsal y medial del raqué. Además, recibe poca inervación noradrenérgica desde el AVT así como entradas colinérgicas.

1.2 TIPOS NEURONALES EN EL ESTRIADO

1.2.1 Neuronas espinosas medianas (NEMs)

En el estriado existen diversos tipos celulares, los cuales pueden ser clasificados por la distinta expresión de péptidos, receptores, así como por sus propiedades electrofisiológicas (Figura 3). El principal tipo celular son las neuronas espinosas medianas (NEMs) o neuronas de proyección, representando cerca del 98% de las células estriatales en ratas (Rymar *et al.*, 2004) y 77% en primates no humanos (Kemp y Powell, 1971). Se caracterizan por ser de fenotipo GABAérgico, tener un diámetro somático de 10-20 μm que da origen a 3-5 dendritas primarias que se ramifican hasta llegar a 25-30 dendritas terminales, además de poseer alta densidad de espinas dendríticas, característica de la cual deriva su nombre.

Químicamente se pueden diferenciar dos poblaciones de NEMs por el tipo de neuropéptido que co-expresan junto con GABA. La primera sintetiza sustancia P y dinorfina, además de expresar preferentemente el receptor dopaminérgico D_1 , la segunda sintetiza encefalina y expresa preferentemente el receptor D_2 (Gerfen *et al.*, 1990). Sin embargo, existen reportes en donde se ha observado la co-localización de ambos neuropéptidos, así como de los dos receptores dopaminérgicos; no obstante, éstas se presentan en un menor porcentaje (Deng *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Las NEMs proyectan la información mediante dos vías, una vía directa y una vía indirecta, utilizando GABA como principal neurotransmisor (Gerfen y Wilson 1996; Tepe y Lee., 2007) (Figura 3). Las NEMs de la vía directa (GABA/Sustancia P, dinorfina) proyectan hacia el GP interno y externo, así como a la SNr. Las de la vía indirecta (GABA/encefalina), proyectan hacia el GP externo y núcleo subtalámico (Gerfen y Wilson 1996; Hauber, 1998) (Figura 2). Funcionalmente, ambas vías tienen respuestas finales antagónicas; la vía indirecta está relacionada con la inhibición de la acción motora,

mientras que la vía directa la promueve (este tema será abordado más adelante con más detalle).

1.2.2 Interneuronas estriatales

El remanente celular (2-3% en ratas y 23% en primates), son interneuronas que se pueden dividir en dos tipos: interneuronas colinérgicas (aproximadamente 0.3% en ratas; Rymar *et al.*, 2004) e interneuronas GABAérgicas (aproximadamente 2%; Rymar *et al.*, 2004) (Figura 3). Dentro de las interneuronas GABAérgicas existen tres tipos principales, definidas por su fenotipo electrofisiológico y químico. Las primeras conocidas como interneuronas de bajo umbral de disparo (*Low threshold spiking*, LTS), las cuales co-expresan neuropéptido Y, somatostatina, así como las enzimas NADPH diaforasa y óxido nítrico sintetasa. A las segundas se les conoce como de espiguelo rápido (*Fast spiking*, FS), éstas co-expresan la proteína de unión a Ca^{2+} , parvalbúmina, y poseen receptores nicotínicos. Por último se encuentran las que co-expresan calretinina, una proteína de unión a Ca^{2+} (Hauber, 1998; Tepper y Bolam, 2004).

La interneurona gigante colinérgica es la más grande de las interneuronas dentro del estriado. Estas interneuronas realizan contactos sinápticos sobre las NEMs, e inervan a las interneuronas FS (Koós y Tepper, 2002). Reciben aferencias excitatorias principalmente del tálamo, además de entradas GABAérgicas. Son moduladas pre-sinápticamente por aferencias dopaminérgicas de la SNc a través de receptores pre-sinápticos de tipo D_2 . Otra de sus características es que poseen disparos espontáneos en ausencia de entradas sinápticas (Bennet y Wilson, 1999).

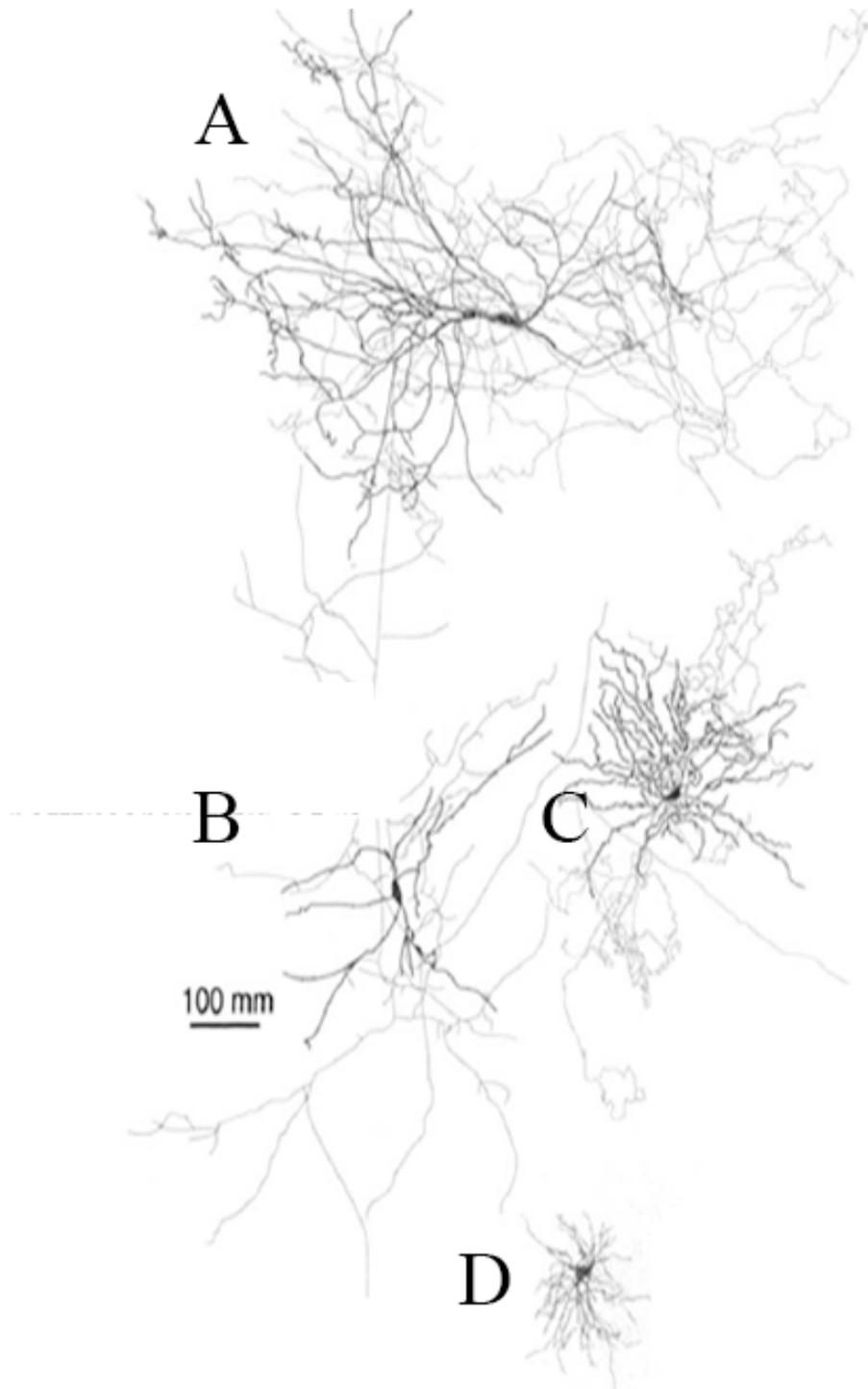


Figura 3. Principales tipos celulares del estriado. A. Interneurona colinérgica. **B.** Interneurona somatostatina/óxido nítrico sintetasa. **C.** Neurona espinosa mediana. **D.** Interneurona GABA/parvalbúmina.

Las interneuronas GABAérgicas que coexpresan parvalbúmina (las FS), son heterogéneas en tamaño, encontrándolas dentro del rango de 50-100µm. Hacen contacto sináptico sobre los somas y dendritas proximales de las NEMs (Kubota y Kawaguchi, 2000). Reciben aferencias excitatorias desde la corteza, así como entradas de interneuronas colinérgicas y GABAérgicas de las NEMs y del GP (Bolam y Bennett, 1995). Se les conoce como de disparo rápido debido a que presentan una frecuencia de disparo alta (hasta 300Hz).

Las interneuronas GABAérgicas que co-expresan somatostatina, neuropéptido Y, NADPH-diaforasa y óxido nítrico sintetasa, es decir, las de tipo LTS, constituyen poco menos del 1% del total de neuronas del estriado (Rymar *et al.*, 2004). Reciben entradas monosinápticas excitatorias de la corteza y del tálamo, y GABAérgicas de las aferencias del GP (Bolam y Bennett, 1995). La principal característica electrofisiológica de estas interneuronas es que presentan “espigas de calcio de bajo umbral”, lo que da origen a su nombre.

Existen otros tipos de interneuronas GABAérgicas, tales como las que contienen calretinina que representan al 0.5% de las neuronas estriatales (Rymar *et al.*, 2004) y las que contienen tirosina hidroxilasa (TH, Unal *et al.*, 2011). Estas interneuronas son las que han sido menos caracterizadas.

1.3 VÍAS DEL MOVIMIENTO EN LOS GB: VÍA DIRECTA E INDIRECTA

Albin (1989) y DeLong (1990) propusieron un modelo funcional de los GB, el cual supone que las conexiones que provienen del estriado forman dos vías principales. Estas vías se distinguen por sus proyecciones a diferentes núcleos blanco, la vía directa formada por neuronas que proyectan directamente hacia el GP interno y/o hacia la SNr, así como hacia el GP externo, teniendo acceso inmediato y directo hacia las estructuras de salida de los GB; y la vía indirecta formada por neuronas que proyectan hacia el GP externo, la cual a su vez proyecta hacia el núcleo subtalámico y éste hacia el GP interno/SNr (Figura 2).

Se ha propuesto que el comportamiento asociado a los GB, es decir el movimiento como respuesta, depende del patrón de disparo de los núcleos de salida de los GB (Albin *et al.*, 1989, DeLong *et al.*, 1990; Hikosaka *et al.*, 2000). Las neuronas de los núcleos de salida, las cuales son GABAérgicas, tienen disparos tónicos². Las NEMs (también GABAérgicas), que proyectan a estos núcleos de salida no tienen potenciales de acción en condiciones basales; esto provoca que, en ausencia de actividad glutamatérgica corticoestriatal (excitación), las NEMs se encuentren inhibidas, y por ende, las neuronas GABAérgicas de los núcleos de salida (GPi/SNr) con actividad tónica, se encuentran activas ante la falta de inhibición, provocando la inhibición de los núcleos blanco (circuitos tálamo-corticales encargados de la ejecución del movimiento o al colículo superior y formación reticular), lo cual inhabilita la ejecución del movimiento (Tecuapetla-Aguilar, 2007).

Al activarse el sistema, se promueve el disparo de las NEMs (Wilson y Kawaguchi, 1996). Esto provoca que las neuronas de la vía directa (GABAérgicas), inhiban la respuesta tónica de las neuronas GABAérgicas de los núcleos de salida de los GB (SNr y GP interno), lo cual transforma la inhibición en ausencia de actividad glutamatérgica, en desinhibición en presencia de actividad glutamatérgica, promoviendo la activación de los circuitos motores permitiendo la ejecución del movimiento.

En contraste, la descarga de las neuronas de la vía indirecta inhibe a las neuronas GABAérgicas del GP externo, que también tienen actividad tónica. Esto provoca que las neuronas del GP externo no inhiban a los núcleos de salida (SNr y GP interno), por medio de dos mecanismos: por la falta de inhibición ejercida por el GP externo hacia las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico y por la falta de inhibición del GP externo directamente a las neuronas de la SNr/GP interno. Ambos mecanismos incrementan la excitación de las neuronas de la SNr y GP interno. Esto provoca la liberación de GABA hacia el tálamo, y la inhibición de los núcleos motores blanco, inhabilitando así los movimientos. Se ha propuesto que esta acción de la vía indirecta atenúa o termina los

² Actividad tónica es cuando la neurona dispara en condiciones basales.

movimientos asociados a los GB o suprime la secuencia de los movimientos no deseados (Tecuapetla-Aguilar, 2007).

Según el modelo tradicional de los GB, los receptores dopaminérgicos cumplen una función importante en la activación de la vía directa o indirecta. La activación de estos receptores se da por la dopamina liberada en el estriado desde terminales provenientes de la SNc, la cual modula la excitabilidad de la membrana de las NEMs (Surmeier *et al.*, 1995).

Los receptores dopaminérgicos se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a sus homologías estructurales y cascadas de segundos mensajeros activados: grupo D₁ (D₁ y D₅) y grupo D₂ (D₂, D₃ y D₄). Tras la activación de un receptor del grupo D₁ se activan las proteínas G_{αe} (Neve *et al.*, 2004) que estimulan la producción de la enzima adenilato ciclasa, la cual induce un aumento en la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que activa la vía de señalización de la proteína cinasa K (PKA). Asimismo, puede activar también otros segundos mensajeros como 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG) mediante la activación de fosfolipasa C. La PKA tiene diversos objetivos intracelulares incluyendo factores de transcripción, canales dependientes de voltaje y receptores glutamatérgicos (Svenningsson *et al.*, 2004). El segundo grupo, el de los receptores D₂, activa a las proteínas G_{αi} (Neve *et al.*, 2004), que inhiben a la enzima adenilato ciclasa y a canales de Ca²⁺, incrementan la conductancia de K⁺, activan al intercambiador Na⁺/H⁺ y activan a la fosfolipasa C (Neve *et al.* 2004). También pueden activar otras vías como la de ERK (Kim *et al.* 2004) y a la cinasa terminal de Jun (Luo *et al.*, 1998).

1.3.1 ¿Cuál es la relación de la dopamina y la actividad de las NEMs?

La despolarización de las NEMs requiere entradas glutamatérgicas provenientes de la corteza, pero los disparos de potencial de acción de las NEMs dependen del estado de su potencial de membrana, el cual se modifica de un estado despolarizado a un estado hiperpolarizado bajo la influencia de la dopamina (Wilson y Kawaguchi 1994). Esta acción moduladora es regulada diferencialmente mediante receptores D₁ (excitatorios) y receptores

D₂ (inhibitorios, Kitai y Surmeier, 1993; West *et al.*, 2003) los cuales se encuentran principalmente segregados en la vía estriatal directa e indirecta, respectivamente.

La dopamina actúa en ambas vías (directa e indirecta) mediante receptores D₁ y D₂ respectivamente, facilitando el movimiento voluntario (en la vía directa) y el involuntario (vía indirecta). La activación de los receptores de la vía directa provoca la activación de las NEMs y por ende la liberación de GABA hacia el GP interno/SNr, lo cual disminuye la actividad de estos núcleos y la subsecuente inhibición del tálamo, por lo que este último se activa, facilitando el movimiento. Por otro lado, la activación de receptores de la vía indirecta produce la inhibición de las NEMs de esta vía, por lo que la actividad del GP externo incrementa. Esto promueve la liberación de GABA hacia el núcleo subtalámico y por ende la inhibición de éste. La reducción en la liberación de glutamato desde las terminales subtalámicas ocasiona una disminución de la actividad del GP interno/SNr, sin embargo éstos núcleos tienen disparos tónicos por lo que siguen liberando GABA hacia el tálamo e inhibiéndolo (Figura 2).

Asimismo, la dopamina liberada en el estriado bloquea la transmisión corticoestriatal glutamatérgica (Galva y Wichmann, 2007), inhibiendo la liberación de glutamato de las terminales glutamatérgicas corticales mediante la activación de receptores del grupo D₂ (Xiao *et al.*, 2009). Otras de las funciones de la dopamina estriatal es regular otros sistemas de transmisión como GABA y ACh: modula la transmisión GABAérgica presináptica mediante receptores del grupo D₂ y regula la liberación de ACh (Tepper y Bolam, 2004).

1.3.2 Controversia del modelo tradicional de los GB

Actualmente, el modelo tradicional de la vía directa e indirecta de los GB es controversial. Se ha reportado que muchas de las NEMs proyectan a ambos segmentos del GP y que los receptores dopaminérgicos co-localizan en algunas de las NEMs (Surmeier *et al.*, 1992; Kawaguchi *et al.*, 1990).

En las NEMs del estriado se han detectado los cinco tipos de receptores dopaminérgicos mediante la técnica de transcripción reversa, seguida de la reacción de polimerasa en

cadena (RT-PCR) en células disociadas del estriado (Surmeier y Kitai, 1993; Nicola *et al.*, 2000). Estos trabajos demostraron que el 46% de las NEMs positivas para sustancia P (vía directa) expresan ácido ribonucleico mensajero (RNAm) para el receptor D₁, mientras que un 25% de NEMs que co-expresan encefalina (vía indirecta) expresan altos niveles de RNAm para receptor D₂. Sin embargo, un porcentaje de NEMs que co-expresan sustancia P también expresan RNAm para el receptor D₂ (19%), D₃ (38%) y/o D₄ (25%). Adicionalmente, las NEMs que co-expresan encefalina también expresan RNAm para los receptores D₁ y D₅, además de que un 25% de éstas también co-expresa receptores D₁ y D₂. Sin embargo, estudios de hibridación *in situ* apoyan la idea de la segregación de receptores dopaminérgicos (Wang *et al.*, 2006).

A pesar de que los datos ponen en cuestión la segregación de los receptores dopaminérgicos (D₁ y D₂) en ambas vías (directa e indirecta respectivamente), la función que tiene la vía directa y la vía indirecta en el movimiento no es discutida. Recientemente, un estudio realizado por Kravitz y colaboradores (2010), demostró por primera vez *in vivo* la segregación preferente de los receptores dopaminérgicos y la función diferencial de la activación específica de los receptores D₁ y D₂. En dicho estudio se utilizó como técnica una herramienta novedosa conocida como optogenética, en la cual se acopló al genoma del ratón el transcrito para rodopsina-2³ en el material genético que codifica para el receptor D₁ (vía directa) o D₂ (vía indirecta) en las NEMs (Figura 4), y mediante la estimulación luminosa (longitudes de onda), se provocó la activación específica del receptor de la vía directa (D₁) o el receptor de la vía indirecta (D₂). Asimismo, al acoplar la proteína amarilla fluorescente se identificó la localización de dichos receptores, y por ende se comprobó la segregación anatómica de las vías y se correlacionó con la conducta.

³ La rodopsina es un pigmento encontrado en la retina del ojo. El procesamiento visual inicia con la activación de este pigmento mediante estímulos lumínicos, es una proteína transmembranal encontrada en las células responsables del inicio del procesamiento visual.

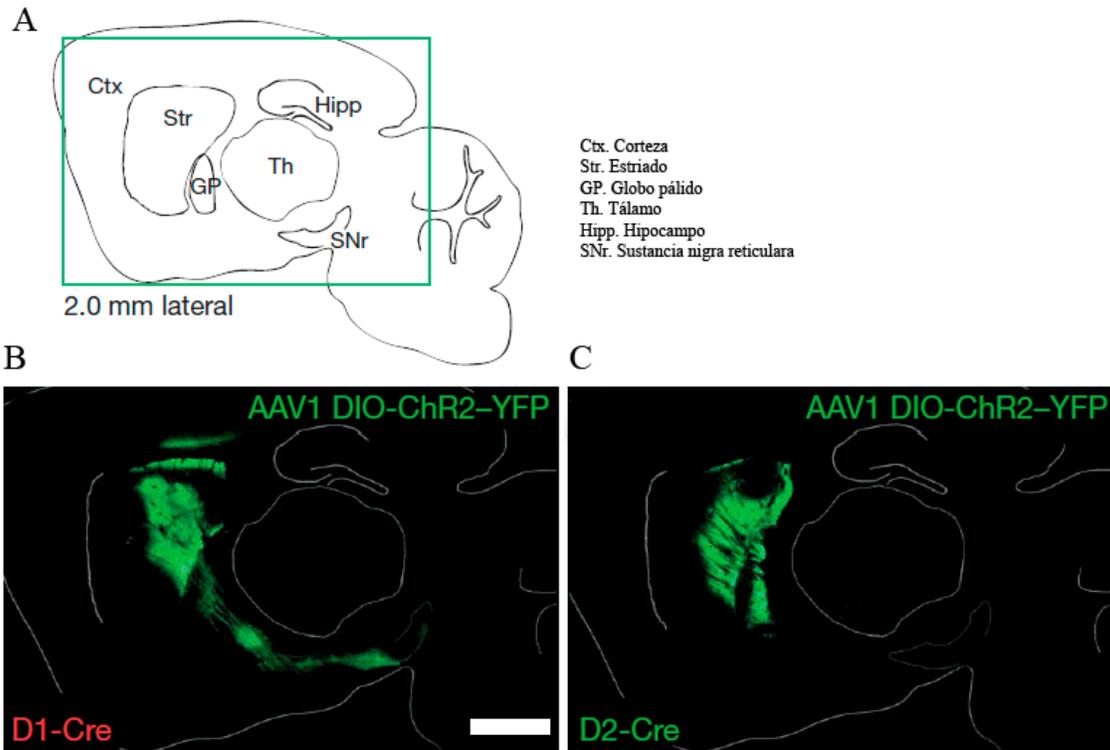


Figura 4. A. Segregación de receptores dopaminérgicos en las vías del movimiento. A. Esquema de un corte sagital del cerebro de ratón. Ctx, corteza; Str, estriado; GP, globo pálido; SNr, sustancia nigra pars reticulata; Th, Tálamo; Hipp, hipocampo. B. Corte sagital que muestra las NEMs de la vía directa en ratones ChR2-YEP seguida de la inyección de AAV1 dependiente de Cre en el ratón transgénico D1-Cre BAC. Los axones de las NEMs de la vía directa proyectan a la SNr. C. Expresión de ChR2-YEP en las NEMs de la vía indirecta del ratón transgénico D2-Cre BAC. Los axones de las NEMs de la vía indirecta proyectan hacia el GP. Escala de las barras en B y C, 1mm. Tomado y modificada de Kravitz et al., 2010.

Este grupo también demostró que la localización de receptores D_1 en los somas de las NEMs es más abundante en somas cuyas proyecciones llegan al núcleo entopeduncular (GP interno en primates) y a la SNr (Figura 4b). Mientras que los somas de las NEMs que expresan los receptores D_2 proyectan hacia el GP externo (Figura 4c). Estas observaciones confirman la segregación mayoritaria de los receptores en dos vías: una vía que expresa principalmente receptores D_1 y otra que expresa preferentemente receptores D_2 .

Para corroborar que la activación de una u otra vía (D_1 contra D_2) produce conductas antagónicas, estimularon cada una de estas vías, encontrando que la estimulación de los ratones D_1 provocaba el incremento en el movimiento del ratón, mientras que la activación de la vía indirecta provocaba una conducta paralizada (Figura 5a, b). Estos datos sugieren que existe una segregación funcional de las vías de los GB en función del receptor dopaminérgico expresado: una vía que facilita el movimiento (D_1) y otra vía que lo inhibe

(D₂). Cabe señalar que las observaciones realizadas por Kravitz y colaboradores no descartan la posibilidad de co-localización de los receptores dopaminérgicos dentro del estriado.

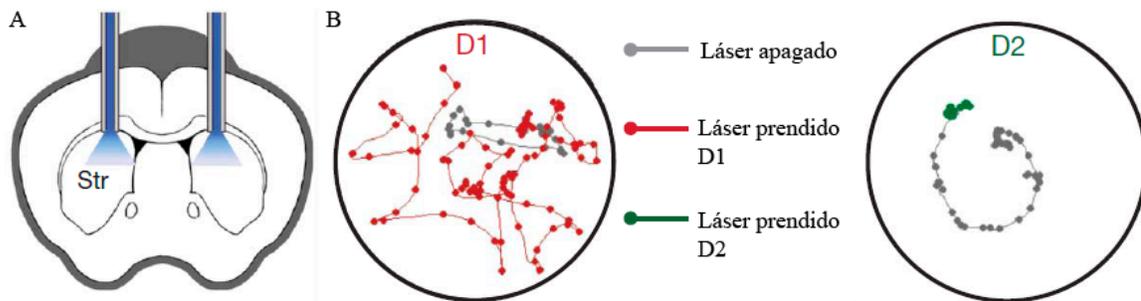


Figura 5. La activación de la vía directa o indirecta indica una regulación motora específica. A. Esquema coronal de la cánula y la estimulación bilateral con fibra óptica. B. Ejemplo de la actividad motora alterada durante la iluminación bilateral estriatal en los ratones D1-ChR2 (izquierdo) y D2-ChR2 (derecho). Las líneas representan el patrón del movimiento, los puntos representan la localización del ratón cada 300ms. Los patrones grises representan la actividad durante 20 s antes de la iluminación; los patrones de colores representan 20 s de actividad durante la iluminación subsecuente. Tomado y modificada de Kravitz et al., 2010.

1.4 LESIONES EN LOS CIRCUITOS DE LOS GB

La lesión de neuronas dopaminérgicas de la SNc provoca una pérdida de las aferencias dopaminérgicas hacia el cuerpo estriado, lo cual genera un desbalance en la interacción de la vía directa y la vía indirecta implicadas en el movimiento, responsable de los síntomas motores presentes en la EP. Esto se debe a que la dopamina es un modulador crucial en el procesamiento estriatal de las sinapsis glutamatérgicas, talámicas, corticales y de las NEMs, regulando funciones motoras (Wickens, 2003).

En reposo, las NEMs tienen un potencial de membrana cercano al potencial de equilibrio del K⁺ (alrededor de -90mV), a lo que se le conoce como *down state*. En respuesta a entradas glutamatérgicas de la corteza, las NEMs se despolarizan. Si las entradas glutamatérgicas carecen de convergencia temporal o espacial, el canal de potasio Kir2 se mantendrá abierto, minimizando la respuesta celular, pero si tienen la convergencia suficiente, la sinapsis glutamatérgica induce el cierre de los canales de potasio Kir2, provocando que el potencial de membrana somático llegue cerca del umbral de disparo, a lo

cual le conoce como *up state*, estado en el cual las NEMs generan potenciales de acción (Gerfen y Surmeier, 2011).

La dopamina modula la sinapsis glutamatérgica responsable de la transición al estado *up state*, y los rasgos cualitativos de su modulación dependerán del receptor dopaminérgico que esté siendo estimulado. Al activarse el receptor D₂ se impide la transición al *up state* de las NEMs de la vía indirecta, lo que reduce la generación de potenciales de acción de esta vía; esto se logra mediante la reducción de la entrada de Ca²⁺ y Na⁺, así como un incremento en la salida de K⁺, adicionalmente hay una reducción de la liberación presináptica de glutamato.

En el caso de las NEMs de la vía directa, la dopamina activa al receptor D₁ (Surmeier *et al.*, 2007) y se infiere que la transmisión corticoestriatal sobre las NEMs de la vía indirecta es inhibida por la activación de receptores D₂, mientras que la transmisión corticoestriatal sobre las NEMs de la vía directa es facilitada por la activación de receptores dopaminérgicos de tipo D₁.

La disminución de dopamina en el estriado provoca muchos cambios a nivel fisiológico, morfológico, eléctrico y conductual. De acuerdo con algunos modelos, posterior a la denervación dopaminérgica (como en los modelos de la EP), la excitabilidad de las NEMs se altera diferencialmente en una u otra vía (Albin *et al.*, 1989; DeLong *et al.*, 1990) . La ausencia de dopamina en el estriado disminuye la activación de las NEMs en la vía directa e incrementa en la vía indirecta, inhibiendo el movimiento voluntario generado por la vía directa.

¿Qué sucede con la vía directa y la vía indirecta en ausencia de dopamina? La vía directa deja de ser estimulada por la dopamina, lo cual implica una disminución de la facilitación en tálamo y tronco encefálico, y por ende de los movimientos. En la vía indirecta, tras la falta de inhibición de las células del estriado por la dopamina, se incrementa el efecto inhibitorio de las NEMs sobre el GP externo, lo que disminuye la actividad del GP externo e incrementa la actividad del núcleo subtalámico, el cual incrementa la actividad del GP

interno/SNr que libera GABA hacia el tálamo y el tronco encefálico, lo que a su vez implica la disminución en la ejecución de los movimientos por la reducción de los impulsos provenientes de la corteza tanto hacia los GB como hacia las vías piramidales y extrapiramidales (Drucker-Colín y Anías Calderón, 2005).

1.5 MICROCIRCUITO GABAérgico EN EL ESTRIADO

La circuitería estriatal que controla la vía directa e indirecta es compleja, y el impacto de la dopamina sobre dicha circuitería le agrega un grado de complejidad aún mayor. Además de los cambios asociados a la denervación dopaminérgica descritos en el capítulo anterior, la denervación presente en los modelos de EP genera alteraciones funcionales mediadas por cambios en los receptores dopaminérgicos, cambios morfológicos en las sinapsis glutamatérgicas en subpoblaciones selectivas de NEMs y cambios en la microcircuitería del estriado (Day *et al.*, 2006).

Dentro de las microcircuiterías estriatales, Gerfen y Surmmeier (2011), consideran cuatro circuitos básicos: circuito cortico-estriatal, circuito cortico-estriatal de tipo *feedforward*, circuito estriatal de tipo *feedforward*, circuito tálamo-estriado de tipo *feedforward* (Figura 6).

1.5.1 Circuito cortico-estriatal

Este circuito se conforma por las neuronas corticales piramidales glutamatérgicas y las NEMs del estriado. Las sinapsis que forman son exclusivamente sobre las espinas dendríticas de las NEMs de ambas vías. A pesar de que se han encontrado diferencias anatómicas entre la vía directa y la indirecta, las implicaciones funcionales aun no son claras.

Una de las diferencias entre ambas vías es su anatomía somatodendrítica (Fujiyama *et al.*, 2011). En roedores se ha observado que la longitud dendrítica total de las NEMs de la vía indirecta es significativamente menor que en las NEMs de la vía directa, debido a que las NEMs de la vía indirecta poseen aproximadamente una o dos dendritas primarias menos

que las de la vía directa, sin diferencia en la densidad de espinas dendríticas; lo cual sugiere que la vía directa recibe más entradas glutamatérgicas que la vía indirecta, haciendo a ésta última más excitable (Gerfen y Surmeier, 2011).

1.5.2 Circuito cortico-estriatal de tipo feedforward y feedback

Adicional a las NEMs GABAérgicas, también existen interneuronas GABAérgicas (descritas anteriormente) en el estriado, las cuales pueden modificar la salida del estriado volviendo al circuito aún más complejo.

Las NEMs pueden ser inhibidas mediante GABA a través de dos mecanismos: por la activación de las interneuronas GABAérgicas (FS principalmente), que liberan GABA hacia las NEMs, y mediante la activación de otras NEMs que también liberan GABA por medio de colaterales hacia otras NEMs. El primero se ha denominado inhibición anterograda o de tipo *feed-forward*, cuyo esquema puede resumirse en: INT→NEMs; mientras que el segundo mecanismo se denomina inhibición por retroalimentación o inhibición tipo *feedback* y cuyo esquema puede resumirse en: NEMs→NEMs (Wilson, 2007) (Figura 6).

Se ha inferido que la inhibición de tipo *feedforward* contribuye a la selección de la acción mediante la eliminación de la actividad de los circuitos de las NEMs asociados a acciones no requeridas. Las interneuronas LTS (positivas a somatostatina), también forman parte del tipo de inhibición *feedforward*; sin embargo, poco se ha descrito al respecto (Tepper *et al.*, 2010).

Las interneuronas FS hacen sinapsis con ambos tipos de NEMs, sin embargo, se ha observado que hay una preferencia de éstas sobre las NEMs de la vía directa (Gittis *et al.*, 2010). Nuevamente se observa una dicotomía entre ambas vías que contribuye a la regulación del circuito. El GP externo es una de las entradas principales hacia las interneuronas FS, siendo esta estructura controlada preferentemente por las NEMs de la vía indirecta. Las neuronas del GP externo expresan receptores dopaminérgicos de tipo D₂, por lo que existe un control dual ejercido por receptores D₂ dopaminérgicos sobre la vía

indirecta, lo que sugiere que su función es atenuada por los niveles de dopamina basal, pero facilitada si disminuyen los niveles de dopamina (Gerfen y Surmeier, 2011).

La inhibición de tipo *feedback* (NEMs→NEMs) refleja el promedio de salida del estriado, ya que las entradas corticales son seleccionadas por la NEMs que son excitadas con mayor intensidad, es decir, la NEM que es excitada por la aferencia cortical inhibe a las NEMs vecinas que ya no podrán disparar, ganando así la salida.

Por otro lado, los axones colaterales de las NEMs dentro del estriado, son muy numerosos, siendo estos axones colaterales blanco para la inhibición de tipo *feedforward* ejercida por las interneuronas FS y LTS. Se ha mostrado que la acción de estas interneuronas sobre las NEMs es lo suficientemente fuerte como para retrasar o inhibir el disparo de potenciales de acción de las NEMs (Koós y Tepper, 1999). La inhibición de tipo *feedforward* puede reflejar el nivel general de la entrada de las NEMs (Wilson, 2007) (Figura 6).

Sin embargo, estos tipos de inhibición han sido propuestos a partir de teorías de control o de redes computacionales artificiales. Además, se debe tomar en cuenta que el balance entre ambos tipos de inhibición podría ser dinámico, dependiendo del grado de sincronía, lo cual podría depender de la acción neuromoduladora de algunos transmisores (Tecuapectla-Aguilar, 2007).

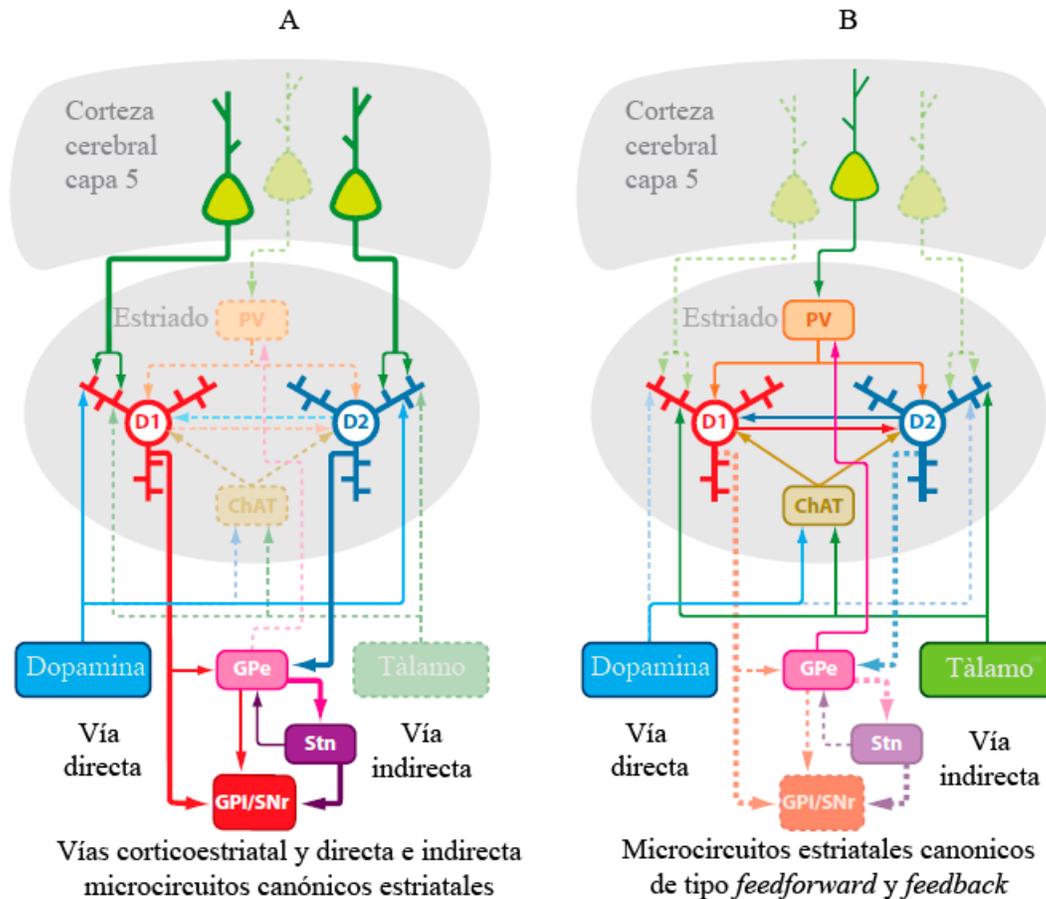


Figura 6. Microcircuitos en los GB. **A.** Circuitos-cortico-estriales y de las vías directa e indirecta. Las neuronas piramidales de la capa cortical 5 proveen entradas excitatorias glutamatérgicas a las espinas de las NEMs de la vía directa (D₁) e indirecta (D₂). Las NEMs D₁ proyectan a los núcleos de salida de los GB (GPi/SNr) mientras que las NEMs D₂ proyectan al GPe. La entrada dopaminérgica a través de la vía nigroestriatal es directamente en las espinas de las NEMs de ambas vías, modulando la entrada cortical. **B.** Circuitos estriales feedforward, feedback y circuitos intrínsecos estriales. Un circuito feedforward involucra a las interneuronas FS que proveen sinapsis perisomáticas en ambas NEMs. Estas interneuronas FS reciben entradas excitatorias de las neuronas piramidales corticales de la capa 5, y son inhibidas por las entradas del GP externo. El núcleo intralaminares talámico provee entradas a las NEMs D₁ y D₂ además de contribuir al circuito feed-forward involucrando entradas talámicas-estriales a las interneuronas colinérgicas que hacen sinapsis con ambos tipos de NEMs. La actividad de las interneuronas colinérgicas también se ve afectada por la entrada dopaminérgica. Los microcircuitos estriales de tipo feedback involucran interconexiones entre los axones colaterales de las NEMs D₁ y D₂ que hacen contactos sinápticos con otras NEMs. Tomado y modificada de Gerfen y Surmeier, 2011.

1.6 ACETILCOLINA (ACh) Y SUS RECEPTORES EN LOS GB

La administración de un antagonista colinérgico fue la primer terapia farmacológica utilizada para la EP, estableciendo el precedente de que la dopamina junto con la acetilcolina (ACh) tienen un desbalance en la EP y de que ambos sistemas de neurotransmisión son fundamentales para el control de los movimientos ejecutados por los GB.

La ACh es un neurotransmisor involucrado en diversas funciones dentro del SNC, entre ellas el movimiento. El estriado es la región del cerebro con mayores niveles de ACh así como de receptores muscarínicos, donde tiene un papel crucial en el control voluntario del movimiento. Los receptores colinérgicos se dividen en dos grandes grupos: ionotrópicos (nicotínicos, nAChR) y metabotrópicos (muscarínicos, MR). Ambos receptores son activados por su ligando endógeno: la ACh. Los MR están acoplados a una proteína G, y su nombre deriva del ligando exógeno muscarina (toxina del hongo *Ammanita muscaria*). Los subtipos de MR incluyen del subtipo M1 al M5.

Los nAChR son una familia de canales iónicos de cinco subunidades sensibles a ligando, conformados por grupos de subunidades idénticas (homopentaméricos) o diferentes (heteropentaméricos). Las subunidades que se expresan en el cerebro del mamífero son: α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y β ($\beta 2$ - $\beta 4$). Dentro del SNC las dos subfamilias más importantes son las sensibles a α -bungalotoxina, las cuales pueden ser heteropentaméricos y homopentaméricos (como el $\alpha 7$ -nAChR, principal subtipo de receptor homopentamérico) y los que no son sensibles a bungalotoxina, todos heteropentaméricos, como el $\alpha 4\beta 2$ -nAChR. Los nAChR se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC y son principalmente presinápticos.

1.6.1 Importancia de los nAChR y la nicotina en los GB

Dentro del sistema nigro-estriatal se han identificado diversos subtipos de nAChR, expresando ARNm para todas las subunidades (Quik y Jeyarasigam, 2000). Dentro del estriado y la SN se han encontrado los subtipos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 4\alpha 6\beta 2$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ y $\beta 2$ (Quik, 2004) (Figura 7). Existe evidencia que sugiere que el $\alpha 4$ nAChR no se encuentra en las

terminales estriatales dopaminérgicas. Los tipos celulares estriatales que poseen nAChR son: las terminales corticales glutamatérgicas, las terminales dopaminérgicas, las NEMs, las interneuronas FS y LTS, así como las interneuronas colinérgicas. La gran cantidad de nAChR dentro de los diversos tipos celulares estriatales, y en general de los GB, lleva a suponer que la acetilcolina tiene un papel importante en la regulación de la actividad motora, cuyo desbalance junto con la dopamina produce alteraciones a nivel conductual. Por ello es importante el estudio de éste sistema de transmisión con el fin de desarrollar posibles terapéuticas mediante la administración de agonistas o antagonistas de estos receptores.

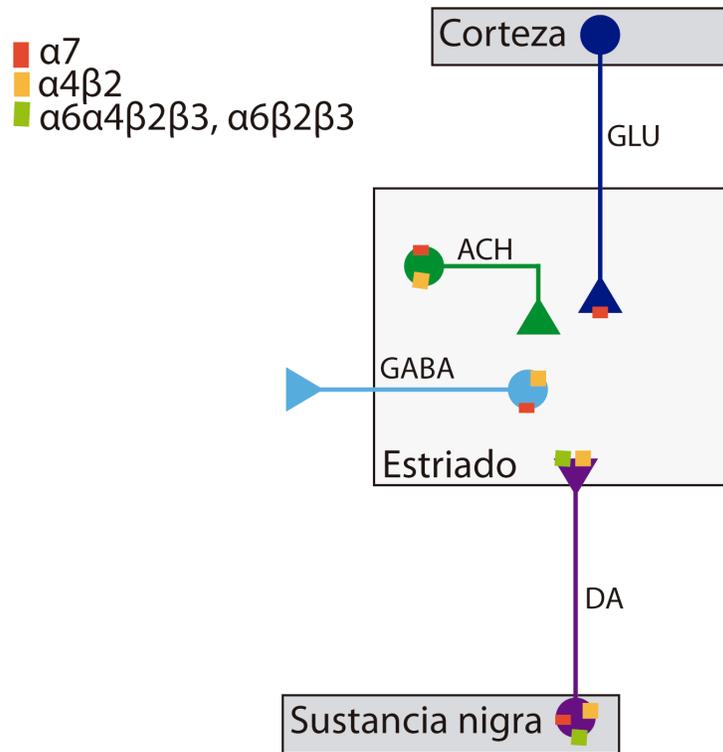


Figura 7. Receptores nicotínicos dentro de los GB. Los receptores nicotínicos se expresan en distintos tipos de neuronas dentro de los GB. Las terminales sinápticas de las neuronas de la corteza expresan el receptor nicotínico $\alpha 7$, Dentro del estriado, los somas de las inter neuronas colinérgicas y neuronas de proyección expresan los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$. Las neuronas dopaminérgicas de la SNc expresan los receptores $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$, $\alpha 6\beta 2\beta 3$ y $\alpha 4\beta 2$ en las terminales sinápticas, mientras que en los somas se encuentran éstos junto con el $\alpha 7$. GLU, glutamato, ACH acetilcolina, DA, dopamina. Tomado y modificado de Maryka & McIntosh 2006.

1.6.2 ¿Cuál es la función de la acetilcolina en el estriado?

Dentro del estriado, la ACh tiene diversas funciones dependiendo del tipo de receptor en el que esté actuando: ionotrópico o metabotrópico. Regula la transmisión GABAérgica además de inhibir la transmisión glutamatérgica mediante MR (Chase *et al.*, 1998). Asimismo regula su propia liberación mediante autoreceptores muscarínicos, así como facilitar la liberación de dopamina mediante nAChR localizados en las terminales dopaminérgicas (Calabresi, 2000; Xiao *et al.*, 2009) (Figura 7 y 8). En la SN, la ACh actúa tanto en la SNr como en la SNc. En la SNr actúa sobre los somas de las neuronas GABAérgicas en las cuales promueve la liberación de GABA hacia la SNc donde también puede actuar en los somas de las neuronas dopaminérgicas, en ambos casos mediante la activación de nAChR (Figura 7 y 8).

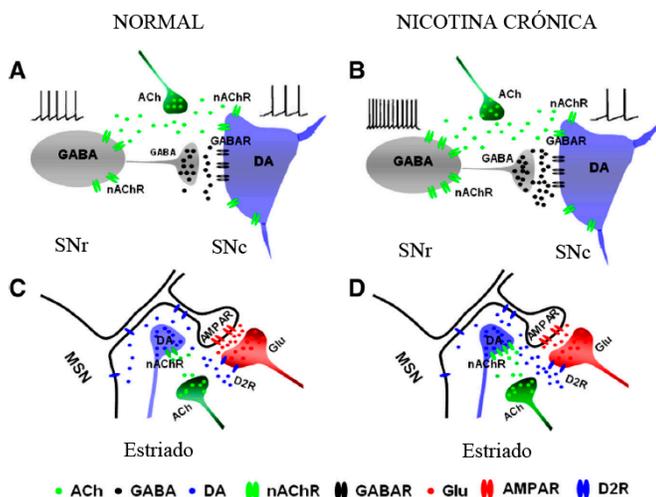


Figura 8. Diagrama del sistema de transmisión colinérgico en la SN y en el estriado. **A**, En la SN la ACh activa receptores nicotínicos (nAChR) presentes en las neuronas GABAérgicas de la SNr y en neuronas dopaminérgicas de la SNc. **B**, Después del tratamiento crónico de nicotina los receptores nicotínicos presentes en los somas de las neuronas GABAérgicas de la SNr se encuentran sobregulados, pero no en las neuronas dopaminérgicas de la SNc. **C**, En el estriado la ACh activa receptores nicotínicos de las terminales dopaminérgicas facilitando la liberación de dopamina. La dopamina activa receptores D2-like de las terminales glutamatérgicas e inhibe la liberación de glutamato (Glu). **D**, El tratamiento crónico de nicotina sobregula los receptores nicotínicos presentes en las terminales dopaminérgicas del estriado, incrementando la liberación de dopamina, causando una mayor inhibición de la liberación de glutamato. Tomado de Xiao *et al.*, 2009.

Una de las funciones importantes de los nAChR es modular la liberación de dopamina desde terminales dopaminérgicas en el estriado. Estudios en roedor han demostrado que la liberación de dopamina en el estriado está mediada presinápticamente por receptores $\alpha 4\beta 2$ (60% de la respuesta total) y receptores $\alpha 6\beta 2$ (40% de la respuesta total), corroborado a partir de estudios en ratones *knockout* para la subunidad $\beta 2$, en los cuales la liberación de dopamina por estimulación de receptores nicotínicos está completamente abatida, sugiriendo que dicha subunidad es crucial para esta función, además de otras subunidades como $\alpha 4$ y $\alpha 6$ (Salminen et al., 2004). Esto también ha sido corroborado en primates pero en proporciones inversas (McCallum et al., 2005).

El uso terapéutico de la nicotina en la EP comienza a partir del hallazgo de que la prevalencia de la enfermedad es menor en personas fumadoras (Baron, 1986; Grandinetti et al., 1994; Fratiglioni y Wang 2000). Actualmente, se infiere que la nicotina se desempeña como un agente neuroprotector, principalmente en las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal, donde se ha observado que el daño asociado a la administración de neurotoxinas como MPTP disminuye significativamente en presencia de nicotina. Este mecanismo neuroprotector involucra la liberación de dopamina mediante la activación de nAChR (Quik y Jayarasasingam 2000; Parain et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente, una de las acciones importantes de los nAChR, es la modulación de la liberación de dopamina desde las terminales dopaminérgicas nigroestriatales (Zhou et al., 2001). Esta función moduladora puede verse afectada en la EP, donde se ha observado que la lesión del sistema nigroestriatal disminuye la expresión de algunos subtipos de receptores nicotínicos, sugiriendo que además de la denervación dopaminérgica al estriado, la dopamina liberada por la actividad nicotínica también se ve afectada (Quik et al., 2003).

Para poder determinar el potencial efecto terapéutico de la nicotina o agonistas nicotínicos en la EP, es necesario comprender las alteraciones que se producen tras la administración crónica de nicotina. Se ha reportado que la administración crónica de nicotina incrementa la expresión de receptores nicotínicos; sin embargo, se desconoce si estos receptores son

funcionales o si se encuentran desensibilizados (Quik *et al.*, 2007). Algunos estudios demuestran que la administración crónica de nicotina aumenta la expresión de nAChR funcionales del subtipo $\alpha 4\beta 2$ en las neuronas GABAérgicas de la SNr, pero no en las de la SNc por ser de baja sensibilidad. Esto provoca que la actividad de la SNr incremente debido al aumento de nAChR, lo cual induce un aumento en la liberación de GABA hacia la SNc, inhibiendo la liberación de dopamina en el estriado (Xiao *et al.*, 2009)

Por otro lado, se ha observado que la administración crónica de nicotina sobreexpresa el receptor $\alpha 4\beta 2$ en el estriado dorsal, presente en las terminales dopaminérgicas, incrementando la liberación de dopamina en el estriado. El incremento de dopamina provoca una inhibición de la liberación de glutamato en las terminales corticales mediante la activación de los receptores D_2 , y por ende una menor actividad de las NEMs (Xiao *et al.*, 2009).

Estas observaciones sugieren una contradicción a nivel fisiológico. Por un lado, el incremento de nAChR en la SNr favorece la inhibición de la liberación de dopamina en el estriado tras inhibir el potencial de acción de los somas dopaminérgicos de la SNc. Por otro lado, el incremento de nAChR en las terminales dopaminérgicas incrementa la liberación de dopamina en el estriado, por lo que la sobrerregulación de nAChR en las terminales dopaminérgicas estriatales o en la SNr podría no ser funcional, ya que tienen funciones antagónicas en el estriado.

Otro efecto observado tras la administración de nicotina, es la desensibilización de los nAChR. La nicotina desensibiliza preferente y rápidamente al receptor $\alpha 4\beta 2$ en las interneuronas GABAérgicas estriatales que inhiben las terminales dopaminérgicas, por lo que disminuye la inhibición de las neuronas dopaminérgicas en el estriado, mientras que mantiene y sostiene la activación de los receptores $\alpha 7$ en los somas dopaminérgicos así como de terminales glutamatérgicas (Wooltorton *et al.*, 2003; Mansvelder *et al.*, 2000).

Otros estudios han mostrado que el tratamiento crónico con nicotina disminuye el número de receptores $\alpha 6$ en ratones, aunque otros trabajos no han podido corroborar esto (Salminen

et al., 2004). Sin embargo, el tratamiento crónico con nicotina parece tener diversos efectos en función del subtipo de nAChR que modifica, lo que sugiere diferentes mecanismos de expresión de los diversos subtipos de nAChR (Quik y McIntosh, 2005).

Por ello es imprescindible determinar las estirpes neuronales que modifican su actividad tras la administración crónica de nicotina, así como la caracterización de los nAChR que se encuentran funcionales y aquellos desensibilizados, con el fin de comprender las alteraciones fisiológicas de las vías involucradas en el movimiento.

La pérdida de dopamina provoca alteraciones en la microcircuitaria del estriado, estos cambios morfológicos ocurren a nivel de receptores, interneuronas, sinapsis, etc. En estudios de modelos de EP se ha demostrado que tras la pérdida de aferencias dopaminérgicas en el estriado, ocurre una disminución significativa en expresión de ciertas poblaciones de receptores colinérgicos; específicamente, se ha observado una disminución de receptores $\alpha 4$, $\alpha 3$ y/o $\alpha 6$ en modelos roedores y primates de la EP. Asimismo, también se ha observado en humanos una reducción en los sitios de unión para $\alpha 4$ así como inmunoreactividad para la subunidad $\alpha 3$. El receptor $\alpha 7$ parece no mostrar ningún cambio (Quik, 2004).

1.7 MODELOS ANIMALES DE LA EP

Actualmente, para la creación de modelos animales de la EP se emplean herramientas que van desde el uso de neurotoxinas hasta la modificación genética de proteínas y receptores que son críticos para el funcionamiento del sistema dopaminérgico. Dentro de éstos últimos, se encuentran los ratones knockout para los genes de α -sinucleína, Parkina y receptores dopaminérgicos.

Los modelos en los cuales se emplean neurotoxinas para generar un daño dopaminérgico a nivel central, provocan alteraciones motoras semejantes a las observadas en la EP. Las dos toxinas más utilizadas son: metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP), y 6-hidroxydopamina (6-OHDA). El primero es utilizado principalmente en ratones y en

primates no humanos. El MPTP es inyectado de manera intraperitoneal, posteriormente atraviesa la barrera hematoencefálica e induce una lesión a nivel central. La principal limitante es que los animales se recuperan espontáneamente de los síntomas, (Sedelis *et al.*, 2000; 2001; Taylor *et al.*, 1997), lo cual impide su uso para el análisis del modelo a largo plazo.

La 6-OHDA es una neurotoxina análoga de las catecolaminas que destruye selectivamente las células catecolaminérgicas. Actúa a nivel central y periférico, pero es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo cual se administra directamente en el cerebro mediante cirugía estereotáxica. La inyección de esta neurotoxina en la vía nigroestriatal produce una degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta*, provocando síntomas motores (Figura 9). Sus efectos neurotóxicos se manifiestan en dos fases, primero se acumula en las neuronas catecolaminérgicas; posteriormente induce una alteración de la homeostasis y un daño severo en esta población neuronal (Lundblat *et al.*, 2004).

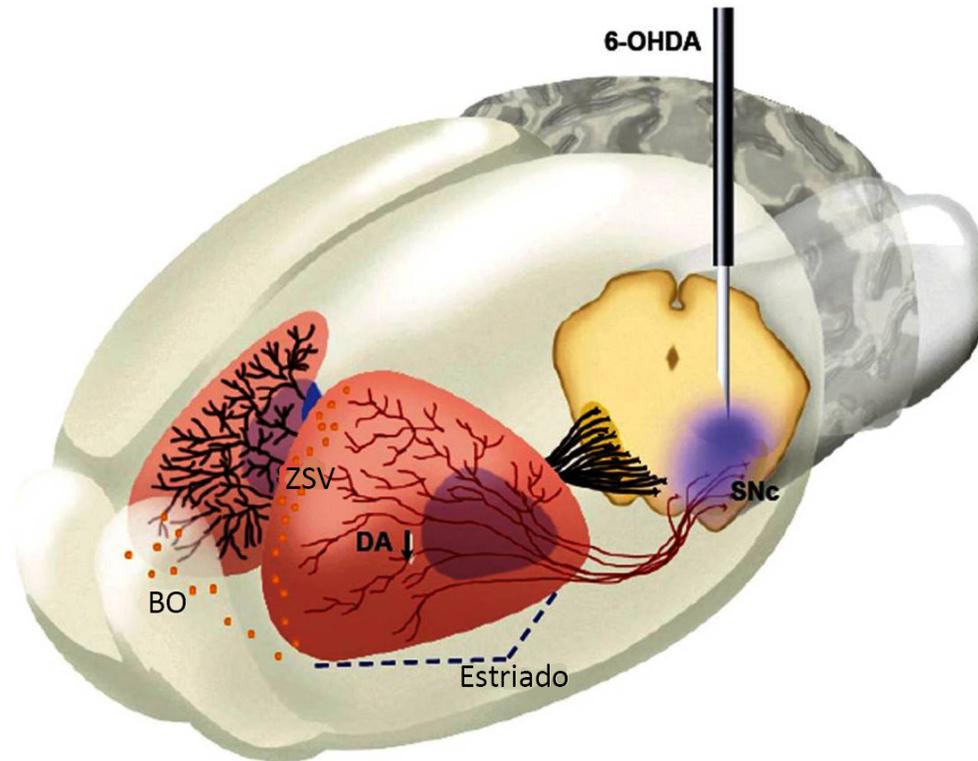


Figura 9. Modelo de la enfermedad de Parkinson. En el modelo en rata de la EP la inyección de 6-OHDA destruye las células dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc) con la subsecuente degeneración de fibras dopaminérgicas hacia el estriado y la disminución de dopamina (DA) en el estriado. BO. Bulbo olfatorio, ZSV. Zona subventricular. Tomado de Arias-Carrión O., 2008.

La neurotoxina ingresa a la célula por los transportadores de dopamina y noradrenalina (DAT y NAT, respectivamente), que reconocen y toman a la 6-OHDA debido a su similitud estructural con las catecolaminas endógenas (Simola y Moreli, 2007). Los daños se deben principalmente a la producción de especies citotóxicas mediante procesos enzimáticos y no enzimáticos. La oxidación de la 6-OHDA por medio de la monoamino oxidasa (MAO-A) genera la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) citotóxico (especies reactivas de oxígeno) y quinonas que atacan grupos nucleofílicos endocelulares (Simola y Moreli, 2007). Esto resulta en una rápida disminución de enzimas antioxidantes endocelulares provocando anomalías en la estructura, metabolismo celular y finalmente muerte neuronal (Figura 10) (Blum *et al.*, 2001).

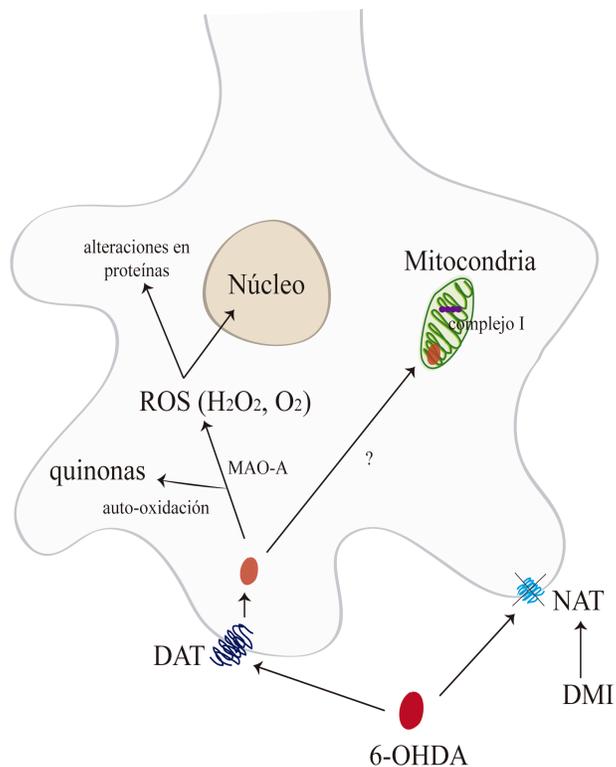


Figura 10. Mecanismo de neurotoxicidad inducida por 6-OHDA. Después de ser tomada del espacio extracelular por los transportadores NAT o DAT la neurotoxina se almacenan en las neuronas catecolaminérgicas. Dentro de éstas activa degradación enzimática a través de MAO-A y auto oxidación, generando muchas especies citotóxicas las cuales producen daño neuronal a través de afectar proteínas endocelulares y el núcleo. Además la neurotoxina puede inducir daño alterando la actividad del complejo mitocondrial I. DMI, es un bloqueador del transportador NAT administrado para prevenir el daño noradrenérgico generando así daño selectivo al sistema dopaminérgico.

1.8 TRATAMIENTO DE LA EP

La terapia farmacológica es el estándar de oro para los pacientes con EP, la cual incluye agonistas dopaminérgicos, anticolinérgicos e inhibidores de la monoamino oxidasa.

El fármaco más utilizado es la Levodopa (L-DOPA), que contrarresta los síntomas motores de la enfermedad al incrementar la dopamina en el SNC. La L-DOPA es un precursor en la síntesis de dopamina que es capaz de atravesar la barrera hematoencefalica, a diferencia de la dopamina. El uso de L-DOPA es efectivo durante las primeras etapas de la enfermedad,

sin embargo, éste fármaco pierde eficacia a largo plazo. Además, la L-DOPA a corto plazo tiene diversos efectos secundarios no deseados como náuseas y vómito, y a largo plazo puede causar fluctuaciones motoras, disquinesias e inclusive psicosis.

Los efectos a largo plazo se pueden deber a que la falta de dopamina en el sistema nigroestriatal provoca que los receptores dopaminérgicos se encuentren hiperregulados (aumentados en número), además de que la estimulación intermitente de los receptores dopaminérgicos altera la sensibilidad de los receptores.

La cirugía es otro de los tratamientos que se emplean en la EP. Dentro de esta categoría se encuentra la estimulación eléctrica profunda, la cirugía ablativa y los trasplantes celulares. La estimulación eléctrica profunda ha probado contrarrestar los síntomas motores de la enfermedad, la estimulación se da en tres áreas: núcleo ventral intermedial del tálamo, en el GP interno y en el núcleo subtalámico.

Los tipos de cirugía ablativa realizados en las personas con EP son la palidotomía y talamotomía. La primera es la lesión selectiva en la porción sensoriomotora del GP interno con el fin de decrementar la influencia inhibitoria de salida de los GB, normalizando la actividad tálamo cortical, lo cual reduce la rigidez, el temblor y la bradicinecia. La segunda es la lesión selectiva del tálamo ventrolateral lo cual reduce el temblor presente en la EP (Narabayashi *et al.*, 1984; Pahua *et al.*, 1997; Bergman *et al.*, 1994)

Los trasplantes celulares son una terapia que busca restablecer la pérdida de las neuronas tras la aplicación de tejido celular. Para esta técnica se han utilizado células fetales, adrenales, mesencefálicas fetales humanas, etc.

A pesar de que existen distintas alternativas para el tratamiento de la EP, ninguno de estos es capaz de revertir o detener la neurodegeneración de la población dopaminérgica. Por ello resulta perentorio el estudio de las bases fisiológicas de la enfermedad, y de los factores que activan la degeneración, esto con el fin de tener un mejor entendimiento de la enfermedad, así como para proponer y generar nuevas alternativas para el tratamiento de la EP.

1.9 TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS DISTINTAS ALTERACIONES OBSERVADAS EN EL MODELO DE EP

1.9.1 Técnicas conductuales

En los modelos animales de la EP, como el de 6-OHDA, una de las técnicas utilizadas para caracterizar las alteraciones motoras presentes en los roedores es la inducción de la conducta de giro mediante agonistas dopaminérgicos como la anfetamina y la apomorfina. En la conducta de giro, el animal presenta estereotipias en el movimiento, al intentar caminar el animal sólo puede girar contralateral o ipsilateralmente al lado donde se encuentra la denervación dopaminérgica, según el fármaco utilizado para la inducción de la conducta.

La apomorfina es un agonista dopaminérgico que estimula directamente los receptores dopaminérgicos, principalmente del grupo D₂. En animales tratados con 6-OHDA, presentan una rotación contralateral al lado lesionado, por lo que el uso de este agonista permite evaluar el lado lesionado.

La explicación tradicional de la conducta de giro inducida por agonistas de receptores dopaminérgicos como la apomorfina, es que las neuronas estriatales responden a la pérdida de dopamina produciendo más receptores, induciendo hipersensibilidad de receptores postsinápticos en el lado lesionado, lo que conlleva a una asimetría en la transmisión dopaminérgica entre el estriado lesionado y el no lesionado, no hipersensibilizado (Kelly *et al.*, 1977; Ungerstedt, 1971; Ungerstedt *et al.*, 1975; Creese *et al.*, 1977; Gerfen, 2003).

Por otro lado, la anfetamina es un agonista dopaminérgico que produce la liberación de dopamina en las terminales nigroestriatales intactas. Induce una conducta de giro ipsilateral al activar presinápticamente los receptores dopaminérgicos, incrementando la liberación de dopamina desde las terminales nigroestriatales que son más abundantes en el lado no lesionado (Ungerstedt *et al.*, 1971a; 1971b; LeDoux, 2005).

Si bien la conducta motora permite estudiar cambios globales en los GB provocados por la denervación dopaminérgica, para el estudio de la regulación a nivel celular de los GB se utilizan técnicas de registro electrofisiológicas (ej: patch clamp) así como el análisis en la expresión genética.

1.9.2 Genes de expresión temprana

Los estímulos del medio ambiente son procesados por el SNC, dentro del cual se producen cambios a distintos niveles. Dentro de estos cambios incluyen la expresión de genes que conllevan a la síntesis de proteínas, derivado de la actividad sináptica generada por el estímulo ambiental. Estos cambios pueden ser transitorios o permanentes, y en ocasiones se encuentran alterados por enfermedades psiquiátricas, neurológicas y neurodegenerativas.

La expresión génica dependiente de actividad sináptica es la responsable de los cambios celulares y moleculares producidos en respuesta a un estímulo. La actividad sensorial provoca la liberación de neurotransmisores, la subsecuente despolarización de la membrana y finalmente el flujo de Ca^{2+} dentro de las neuronas. El incremento de Ca^{2+} produce la activación de cascadas de señalización que son capaces de provocar cambios en una sola neurona, así como a nivel de conectividad sináptica dentro de un circuito neuronal.

Algunos de estos cambios producidos por la entrada de Ca^{2+} incluyen modificaciones postranscripcionales de proteínas, así como la regulación de la traducción de RNAm, lo que provoca la síntesis de nuevas proteínas (Malinow y Malenka, 2002; Sutton y Schuman, 2006). Para que esto ocurra, es necesario activar la transcripción génica resultante de la activación de factores de transcripción dentro del núcleo, que controlan la expresión de genes regulados por actividad neuronal. Algunos genes dependientes de actividad sináptica son los genes de expresión temprana como c-Fos y zif264, los cuales no requieren de la síntesis de nuevas proteínas. La transcripción de c-Fos puede ser inducida en diferentes estirpes neuronales mediante diversos estímulos (Greenberg *et al.*, 1986; Morgan *et al.*, 1987; Hunt *et al.*, 1987; Rusak *et al.*, 1990; Fleischmann *et al.*, 2003).

1.9.3 c-Fos y su relación con actividad neuronal

El gen de expresión temprana c-Fos ha sido relacionado directamente con actividad neuronal, mientras que zif268 se correlaciona más con procesos dependientes de potenciación a largo plazo. Muchos estudios con electrofisiología, han demostrado que la expresión de c-Fos se relaciona con actividad funcional (Hajós et al., 1999; Herry et al., 2007; Librizzi et al., 2007; Yamazaki et al., 2008), también se ha demostrado patrones similares de activación con resonancia magnética funcional (Aoki et al., 2004; Lawrence et al., 2004; Herry et al., 2007).

Existen datos de que tras la lesión del sistema nigroestriatal, la expresión de c-Fos en las neuronas de la vía directa y de la vía indirecta se afecta de manera diferencial (Dragunow *et al.*, 1990; Graybiel *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1989). Robertson y colaboradores (1989) demostraron que la expresión de c-Fos incrementa en respuesta al agonista D₁ en el estriado lesionado. Cenci y colaboradores (1992) demostraron que la amfetamina induce un incremento en el número de células positivas para c-Fos en el estriado en condiciones normales, mientras que en ratas lesionadas también induce un aumento en la expresión de c-Fos en el estriado, pero con un menor número de éstas en el lado lesionado. Por otro lado, la apomorfina induce poca expresión de c-Fos en ratas no lesionadas e incrementa en el estriado lesionado (Figura 19).

Asimismo, la administración tanto aguda como crónica de nicotina ha mostrado tener efectos sobre la expresión de c-Fos en algunas regiones del SNC. La administración aguda de nicotina induce la expresión rápida de c-Fos en diversas áreas del cerebro, incluyendo regiones dopaminérgicas (Ren y Sagar, 1992; Salminen *et al.*, 1996, 1999). En contraste, la administración crónica de nicotina (7 días de infusión), atenúa la expresión de c-Fos en estas regiones (Nisell *et al.*, 1997; Salminen *et al.*, 1999).

Se ha propuesto que el receptor D₁ modula la expresión de c-Fos inducida por nicotina en el estriado, núcleo *accumbens* y corteza prefrontal, tomando en cuenta el antecedente de que

el antagonista D₁ (SCH23390), bloquea completamente esa inducción (Kiba y Jayaraman, 1994; Nisell *et al.*, 1997).

Sin embargo, otros estudios han mostrado que la administración crónica de nicotina incrementa significativamente la expresión de c-Fos en el estriado (Shim *et al.*, 2001; Marttila *et al.*, 2006), donde se ha relacionado el aumento de la liberación de dopamina en el estriado y en el núcleo *accumbens* con el incremento en la expresión de c-Fos tras el tratamiento crónico de nicotina (Shim *et al.*, 2001).

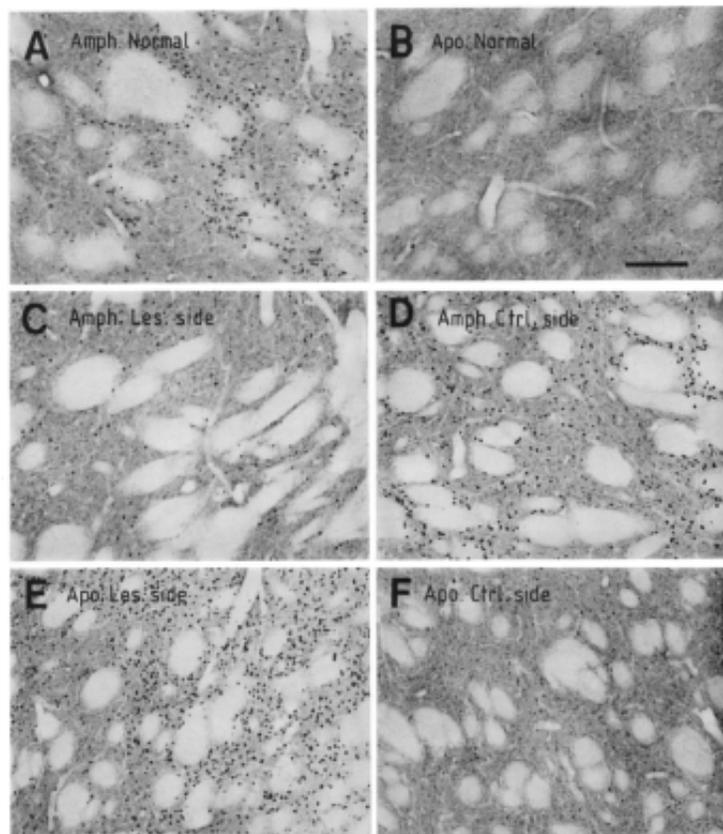


Figura 11. Expresión de c-Fos en el estriado. A, C y D expresión de c-Fos inducida con amfetamina. B, E y F expresión de c-Fos inducida con apomorfina. A y B, ratas sin daño. C y E hemisferio lesionado. D y F hemisferio no lesionado. Tomada de Cenci *et al.*, 1992.

C A P I T U L O 2: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dadas las observaciones en estudios epidemiológicos que indican una menor incidencia de EP en fumadores, se ha considerado que la nicotina, o moléculas con acción análoga, podrían ser utilizadas para el tratamiento de ésta enfermedad.

Se ha reportado que los nAChR modulan la liberación de dopamina desde las terminales dopaminérgicas nigroestriatales (Zhou et al., 2001). En la EP, algunos subtipos de receptores nicotínicos disminuyen su expresión, por lo que se sugiere que además de la denervación dopaminérgica del estriado, la dopamina liberada por la actividad nicotínica también se ve afectada (Quik *et al.*, 2003). Sin embargo, los efectos sobre la conducta motora y los circuitos estriatales en los que actúa la dopamina que se encuentran afectados en la EP, aún no han sido determinados.

Tomando en cuenta lo anterior, decidimos determinar si el tratamiento crónico de nicotina tiene un efecto sobre la conducta motora en animales hemiparkinsonianos, así como determinar los cambios en la actividad neuronal dentro del estriado. Adicionalmente, decidimos caracterizar el efecto de la administración crónica sobre las subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas y neuronas de proyección.

Para el desarrollo de nuevas terapias a largo plazo, basadas en el uso de nicotina o moléculas con acción análoga, es necesario sentar las bases moleculares, celulares y conductuales de los efectos de la nicotina crónica sobre los GB.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la administración crónica de nicotina sobre la asimetría motora y en la actividad neuronal del estriado en un modelo roedor de EP.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar los efectos de la administración crónica de nicotina en la asimetría motora inducida por la administración de agonistas dopaminérgicos, en ratas lesionadas con 6-OHDA.
2. Estudiar el efecto de la administración crónica de nicotina sobre la actividad neuronal mediante la expresión de c-Fos inducida con agonistas dopaminérgicos, en el estriado dorsal de ratas lesionadas con 6-OHDA.
3. Determinar si la administración crónica de nicotina modifica la expresión de c-Fos en poblaciones neuronales específicas en el estriado dorsal, en ratas lesionadas con 6-OHDA.

2.4 HIPÓTESIS GENERAL

En un modelo animal de la EP, el tratamiento crónico de nicotina modificará la asimetría motora en animales hemiparkinsonianos además de modificar la actividad neuronal de subpoblaciones de interneuronas y neuronas de proyección dentro del estriado.

2.5 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

1. En un modelo animal de la EP, el tratamiento crónico de nicotina modificará la asimetría motora inducida por la administración de agonistas dopaminérgicos.
2. En un modelo animal de la EP, el tratamiento crónico de nicotina modificará la expresión de c-Fos en el estriado dorsal tras la administración de agonistas dopaminérgicos.
3. En un modelo animal de la EP, el tratamiento crónico de nicotina modifica la expresión de c-Fos en ciertas poblaciones neurales dentro del estriado dorsal.

C A P I T U L O 3: METODOLOGÍA

3.1 ANIMALES

Se emplearon 48 ratas Wistar macho recién destetadas (21-23 días de edad, 70-90 gr de peso). Los animales se mantuvieron en cajas individuales estándar bajo condiciones controladas: temperatura (22°C +/- 1°C), ciclo de luz oscuridad (12 horas empezando a las 6 am) y acceso *ad libitum* al alimento.

Todos los experimentos del presente estudio, fueron realizados de acuerdo a las normas de cuidado del Comité de Bioética y Cuidado de Animales Experimentales del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Cada animal fue asignado aleatoriamente a uno de seis grupos con los siguientes tratamientos:

GRUPO 1: *Lesión con nicotina, LxNic* (N=10). Administración crónica de nicotina vía oral (VO) (ver protocolo de administración de nicotina). Posteriormente fueron lesionadas mediante cirugía estereotáxica en la SNc con la neurotoxina 6-OHDA (ver más adelante).

GRUPO 2: *Sham con nicotina, ShamNic* (N=6). Administración crónica de nicotina vía oral (VO). Posteriormente se sometieron a cirugía estereotáxica mediante la cual se introdujo la cánula en la SNc y se inyectó solución salina 0.9% en lugar de 6-OHDA (ver más adelante).

GRUPO 3: *Lesión agua, LxAgua* (N=10): Se les dio agua en lugar de nicotina. Posteriormente fueron lesionadas mediante cirugía esterotáxica en la SNc con la neurotoxina 6-OHDA.

GRUPO 4: *Sham agua, ShamAgua* (N=6). Se les dio agua en lugar de nicotina. Posteriormente se sometieron a cirugía estereotáxica mediante la cual se introdujo la cánula en la SNc y se inyectó solución salina 0.9% en lugar de 6-OHDA.

GRUPO 5: *Sin lesión con nicotina, Nic* (N=8). Se les administró nicotina VO de manera crónica (ver protocolo de administración de nicotina).

GRUPO 6: *Sin nicotina ni lesión, Agua* (N=8). Se les dio agua en lugar de nicotina.

Cada grupo experimental fue dividido en dos. A la mitad se les administró de forma intraperitoneal (IP) anfetamina y a la otra mitad apomorfina de manera subcutánea durante la prueba de giro (Figura 12).

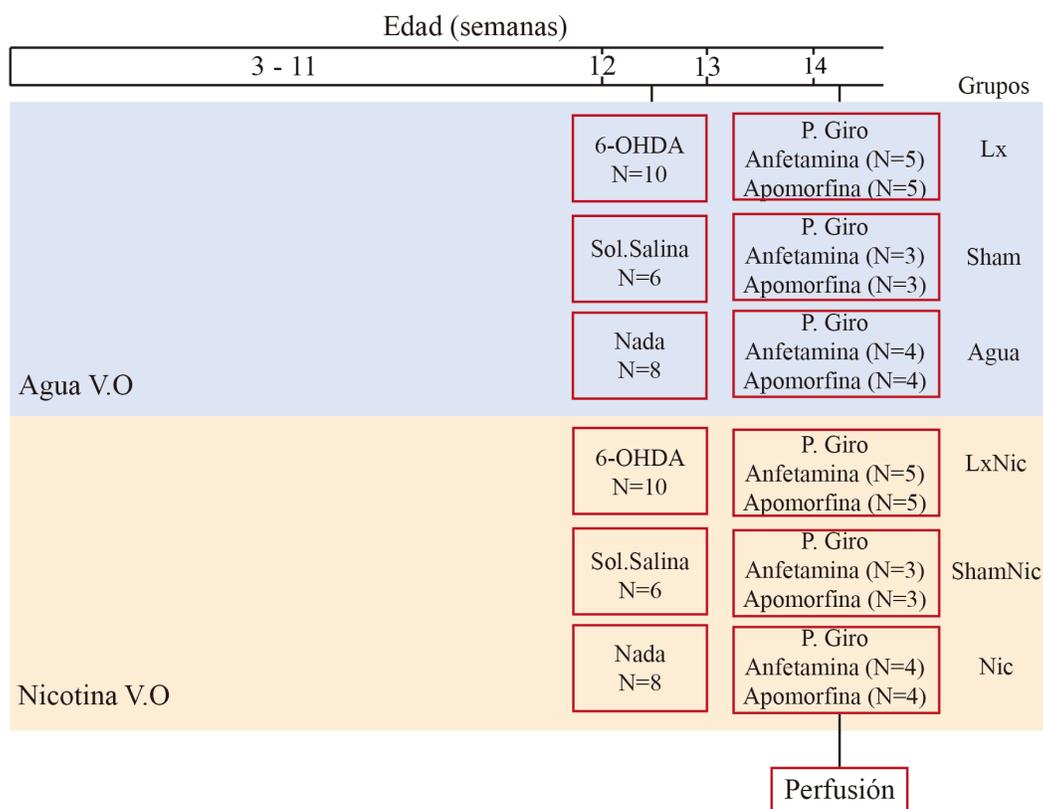


Figura 12. Diseño experimental. Los animales de 21 días de edad (3 semanas) comienzan el tratamiento crónico de nicotina vía oral (V.O, grupos LxNic, ShamNic y Nic). Después de 12 semanas, los animales son sometidos a cirugía estereotáxica para inducir la lesión de las neuronas dopaminérgicas de sustancia nigra compacta (Lx y LxNic), o

administrar solución salina (Sham y ShamNic). A las dos semanas después de la lesión, los animales se evalúan mediante la prueba de giro inducida con anfetamina o apomorfina. Finalmente se sacrifican y perfunden al final de la prueba.

3.2 PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE NICOTINA

El protocolo de administración de nicotina se enfocó en emular el patrón de consumo de nicotina en humanos, el cual se caracteriza por ser crónico y con acceso *ad libitum*. Asimismo, este protocolo se ha establecido para simular las concentraciones plasmáticas de nicotina en personas fumadoras (160-250nM) (Lehouezec, 1989), ha demostrado que las concentraciones de cotinina⁴ en orina son semejantes a las de personas fumadoras (2.4×10^3 ng/mL) (García-Montes JR *et al.*, 2012).

La nicotina se disolvió en agua bidestilada y se colocó en dos probetas iguales de 100 ml. La concentración de nicotina comenzó de 15 mg/L de agua del día 1 al 15. Posteriormente, del día 16 al 23 se incrementó a 18 mg/L. Del día 24 al 31 se incrementó a 21 mg/L, luego a 24 mg/L del día 32 al 39, 27 mg/L del día 40 al 47 hasta llegar a la concentración final de 30 mg/L del día 48 al 56. El aumento gradual de la dosis se realizó con el fin de evitar aversión y estrés en los animales.

El acceso al agua con nicotina fue restringido gradualmente. Del día 1 al 15, se colocaron en cada caja dos bebederos con nicotina (15mg/L). Del día 1 al 4, el agua con nicotina se colocó por 24 horas (*ad libitum*); del día 5 al 9 se restringió el consumo a 12 horas seguidas, y a partir del día 10 la restricción cambió a 8 horas (dos periodos al día de 4 horas).

Durante una semana (día 57 al 65), se llevó a cabo la medición diaria del consumo de nicotina. Finalmente el día 66 se realizó la lesión de la SNc a los grupos LxNic, LxAgua y Sham, continuando el suministro de nicotina (30 mg/L) hasta el sacrificio de los animales (día 81).

⁴ Es un alcaloide hallado en el tabaco y es un metabolito de la nicotina.

Este protocolo ha sido validado previamente (Vieyra-Reyes, 2008). El presente protocolo de administración fue elegido debido a que la nicotina administrada parenteralmente (intravenosa), tiene efectos relativamente cortos, por lo que se requerirían de varias dosis para lograr los mismos efectos observados en fumadores (Vieyra-Reyes, 2008). El método de acceso libre a dos bebederos ha sido muy utilizado en estudios de auto-administración oral de diferentes drogas (alcohol, cocaína, nicotina). Adicionalmente, este método evita la manipulación excesiva y el estrés provocado por ésta en las ratas (Vieyra-Reyes, 2008).

3.3 LESION CON 6-OHDA

La degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y sus proyecciones hacia el estriado se realizó mediante cirugía estereotáxica, administrando la neurotoxina 6-OHDA (Sigma) directamente en la SNc del hemisferio izquierdo.

La 6-OHDA se disolvió en solución salina al 0.9% suplementada con ácido ascórbico al 2%. La concentración final utilizada de la neurotoxina fue 80 µg/µl, administrando un volumen final de 0.5 µl (N=20). A los grupos Sham solo se les administró solución salina al 0.9%.

Los animales se anestesiaron con un coctel de Ketamina-Xilacina a una dosis de 90-10 mg/kg de peso (1:10). Las coordenadas utilizadas partiendo de Bregma fueron: antero-posterior -4.7mm, lateral -1.6mm y ventral -8.1mm (Paxinos y Watson, 1986). La inyección se realizó a una velocidad de 1.25 µg/min. La cánula fue retirada 5 minutos después de que finalizó la inyección para evitar el flujo retrógrado de la toxina o la solución salina y una difusión correcta de éstas.

3.4 CONDUCTA DE GIRO INDUCIDA CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS

Como se mencionó anteriormente, durante la prueba de giro se dividieron los grupos en dos partes iguales, administrando amfetamina (d-Amfetamina sulfato, Sigma, A-5880)no apomorfina (R-(-)-Apomorfina hidrocloreto hemihidratada, Sigma, A4393) para inducir la conducta de giro.

Los giros fueron registrados con un girómetro, conectado a un sensor de movimiento de la rata (giros hacia la derecha y hacia la izquierda). El sensor está conectado a la computadora, la cual mediante un software especial registra los giros durante el tiempo programado.

Previo a la administración del fármaco los animales fueron habituados durante 60 minutos a las condiciones experimentales del girómetro. Se inyectó (i.p.) anfetamina a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, disuelta en solución salina 0.9%, o apomorfina subcutánea diluida a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Los giros fueron registrados 15 minutos después de la inyección de anfetamina, e inmediatamente después de la inyección de apomorfina. El tiempo de registro fue de un periodo de 90 minutos en el caso de anfetamina y de 30 minutos en el caso de apomorfina, en intervalos cada 3 minutos.

3.5 PERFUSIÓN TRANSCARDIACA

El grupo estimulado con anfetamina fue sacrificado a las dos horas y media después de la inyección de la droga ya que la anfetamina alcanza su efecto máximo a los 45 min aproximadamente y la expresión de c-Fos alcanza su máxima expresión a los 90 minutos después de presentar el estímulo.

El grupo estimulado con apomorfina fue sacrificado una hora con cuarenta y cinco minutos después de la inyección, ya que la apomorfina tiene un efecto inmediato y alcanzando el máximo a los 15 min aproximadamente.

Los animales se anestesiaron con una inyección i.p. de pentobarbital sódico (40mg/kg de peso), posteriormente fueron sacrificados y perfundidos transcárdialmente con 250ml de PBS 0.1M (Buffer de fosfatos: Na_2HPO_4 0.1M y NaHPO_4 0.1M, pH 7.4) y posteriormente con paraformaldehído al 4% (PBS 0.1M y paraformaldehído 4%) para fijar el tejido. Finalmente se extrajeron los cerebros y se colocaron en paraformaldehído durante 12 horas para continuar con el fijado. Posteriormente se incubaron en sacarosa al 10%, 20% y 30% durante 24 horas cada concentración a 4°C.

3.6 HISTOLOGÍA

Se realizaron cortes coronales de 30 micras y se recolectaron uno de cada cuatro cortes seriados del estriado y SNc (Figura 13).

Los cortes del estriado fueron procesados para inmunofluorescencia contra c-Fos/parvalbúmina, c-Fos/sustancia P y c-Fos/somatostatina. Los cortes de la SNc y del estriado fueron procesados para la inmunohistoquímica contra Tirosina Hidroxilasa (TH).

Anticuerpos:

- Primarios para fluorescencia: conejo α TH 1:1000 (Chemicon), cabra α c-Fos 1:250 (Santa Cruz), α Sustancia P 1:250, α parvalbúmina 1:1000, α somatostatina 1:250.
- Primarios para inmunohistoquímica: burro α conejo biotinilado 1:250 (Vector labs).
- Secundarios para inmunofluorescencia: Alexa 488 burro anti cabra 1:500 (Jackson Immuno Research); DyLight 649 burro anti ratón y anti conejo 1:500 (Jackson Immuno Research).

3.6.1 Inmunohistoquímica para TH

Para inhibir la peroxidasa endógena se colocaron en ácido peryódico al 0.28% durante 1 minuto a temperatura ambiente y luego en H₂O bidestilada por 5 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS 0.1M, y se incubaron con PBS-BSA (Albúmina Sérica Bovina 2.5%) y Tritón X-100 al 0.1%, a 4°C, durante toda la noche. Después se incubó en anticuerpo primario a 4°C durante 48 horas. Se lavaron en PBS 0.1M y posteriormente se incubaron en el anticuerpo secundario biotinilado durante dos horas a temperatura ambiente.

Los cortes se incubaron por media hora en el complejo steptoavidina-peroxidasa (Vector). Se lavaron los cortes con PBS 0.1M y se reveló con 6 mg de DAB (3,3 Diamino-bencidina;

3.7 CONTEOS CELULARES

Se obtuvieron fotografías en Z de tres secciones (Figura 13) de tres cortes coronales del estriado medial, utilizando un microscopio Leica DM6000B acoplado a una fuente de fluorescencia.

Para llevar a cabo los conteos se utilizó el software libre de análisis de imágenes ImageJ. Las fotografías tomadas en Z se procesaron para obtener un sólo plano (proyección en Z) y fueron convertidas a una imagen de 8 bits.

Se llevó a cabo el conteo semiautomático para el cual se ajustaron los umbrales del color obteniendo una imagen en píxeles blanco-negro (Figura 14 a y b). Se le aplicó a la fotografía el parámetro “línea divisoria” (*Binary/Watershed*) el cual permite separar partículas (células) que puedan estar en contacto o superpuestas para ser cuantificadas independientemente (Figura 14 c). Posteriormente se aplicó el comando “análisis de partículas” (*Analyze Particles*) para realizar los conteos con los parámetros que fueron determinados (Figura 14 d).

Se realizaron los conteos de todos los núcleos (DAPI) y de todas las células positivas para c-Fos en las regiones estriatales (Figura 13) utilizando en todas las imágenes los mismos parámetros. Adicionalmente, se contaron también aquellas células positivas para parvalbúmina y somatostatina, así como su colocalización con células positivas para c-Fos junto con sustancia P corroboradas mediante las proyecciones ortogonales.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos (consumo de nicotina, número de giros y conteos celulares) fueron recolectados y analizados en el programa estadístico SPSS. Para elegir la prueba estadística se determinó la distribución normal con la prueba Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Simon y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene.

Los datos de las gráficas se presentan en porcentajes del número de células c-Fos positivas del total de núcleos o del número de células doble positivas (c-Fos y parvalbúmina/somatostatina/SP) del total de células c-Fos positivas.

Para el análisis estadístico paramétrico, los porcentajes fueron transformados mediante el método función arcoseno.

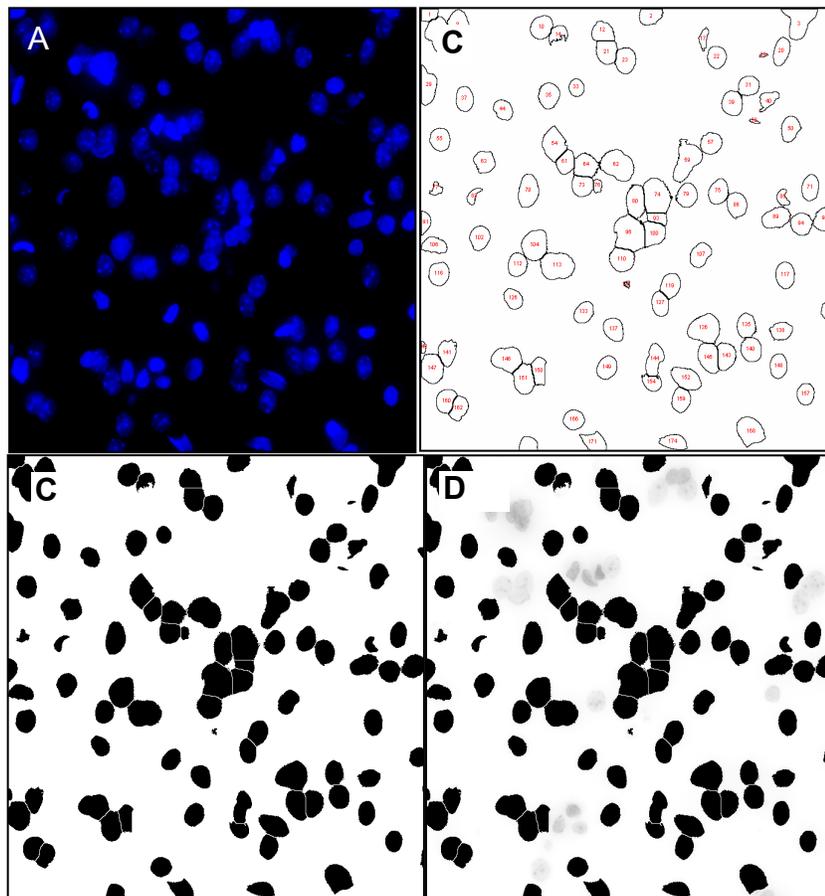


Figura 14. Fotografías que muestran la forma en la que se contaron los núcleos celulares. A. Fotografía original de los núcleos (azul) B. Imagen de 8 bits (blanco y negro) obtenido al ejecutar “línea divisoria”. C. Imagen de los contornos que el programa contó como células al aplicar “análisis de partículas” D. Imagen 8 bits encima de la fotografía original, para corroborar la estandarización de los parámetros.

C A P I T U L O 4: RESULTADOS

4.1 EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE NICOTINA

El consumo de nicotina (mg/kg) se obtuvo a partir de la medición realizada durante quince días consecutivos. Para formar los grupos experimentales con tratamiento de nicotina se utilizó como criterio de inclusión el que los animales hubieran consumido en promedio la misma cantidad de nicotina ($3.38 \pm 1 \text{mg/kg}$), por lo que las ratas cuyos consumos se encontraban en los valores extremos fueron eliminadas. Siguiendo este criterio, las ratas que se seleccionaron para el resto de los experimentos fueron aquellas que se encontraban alrededor de la media de 3.38 ± 0.52 ($N=27$). Después de la lesión con 6-OHDA de estos animales, tres fallecieron, por lo que la N final del grupo que consumió nicotina fue igual a 24 animales.

El nivel crítico arrojado por la prueba Kolmogorov-Smirnov fue de 0.833 (>0.05), lo cual indica que la variable “consumo de nicotina” se distribuyó normalmente.

4.2 ASIMETRÍA MOTORA INDUCIDA CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS

4.2.1 ANFETAMINA

La primera comparación realizada fue del número de giros ipsilaterales al lado lesionado, inducidos con anfetamina, entre los seis grupos. Para elegir la prueba estadística se llevaron a cabo dos análisis previos. Los valores de p obtenidos en el test de normalidad (Shapiro-Wilk), para cada uno de los grupos, fueron mayores a 0.05 aceptando la hipótesis nula de normalidad de los datos (Tabla1) con excepción del grupo Nic ($p=0.42$). Adicionalmente, se utilizó la prueba de Levene cuyo valor del estadístico fue de 1.240 y el valor de $p=0.326$ (>0.05), aceptando la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas.

Test de Normalidad			
		Shapiro-Wilk	
		Estadístico	Sig. (p)
Giros a la izquierda (ipsilaterales al lado lesionado)	Nic	.754	.042
	Agua	.958	.808
	LxNic	.986	.776
	LxAgua	.804	.110
	ShamNic	.912	.409
	ShamAgua	.991	.822

Tabla 1. Muestra los datos obtenidos en el test de normalidad de los seis grupos. El análisis se realizó en el programa SPSS Statistics 17.0. El grupo Nic fue el único grupo cuyo valor p fue <0.05 .

Una vez corroborado que los datos de los diferentes grupos tenían una distribución normal (con excepción del grupo Nic) y que existía homogeneidad de varianza entre ellos, se procedió a comparar las medias de los grupos a través de la prueba T-Student para muestras independientes. Se llevaron a cabo todas las comparaciones posibles, las cuales incluyen: LxAgua vs Agua, ShamAgua, LxNic, Nic y ShamNic. LxNic vs Nic, ShamNic, Agua, ShamAgua. Nic vs ShamNic, Agua, ShamAgua. ShamNic vs Agua, ShamAgua. Agua vs ShamAgua. Los resultados muestran (Figura 15a) que existen diferencias significativas únicamente entre los grupos Lx vs Agua ($t=-2.574$, $p=0.033$) y LxNic vs Nic ($t=-2.679$ y $p=0.044$). No hay diferencia significativa entre los grupos Lx vs LxNic ($t=-0.749$, $p=0.475$). Sin embargo, es importante señalar que en un estudio realizado en el laboratorio con una N más grande, se encontró diferencia significativa al comparar estos dos grupos (García-Montes *et al.*, 2012), con una media menor en el caso de los animales tratados previamente con nicotina.

En resumen, en el presente trabajo se observó que el tratamiento crónico con nicotina tendió a reducir la asimetría motora producida por la liberación de dopamina inducida con anfetamina, en ratas hemiparkinsonianas.

Asimetría motora inducida con agonistas dopaminérgicos

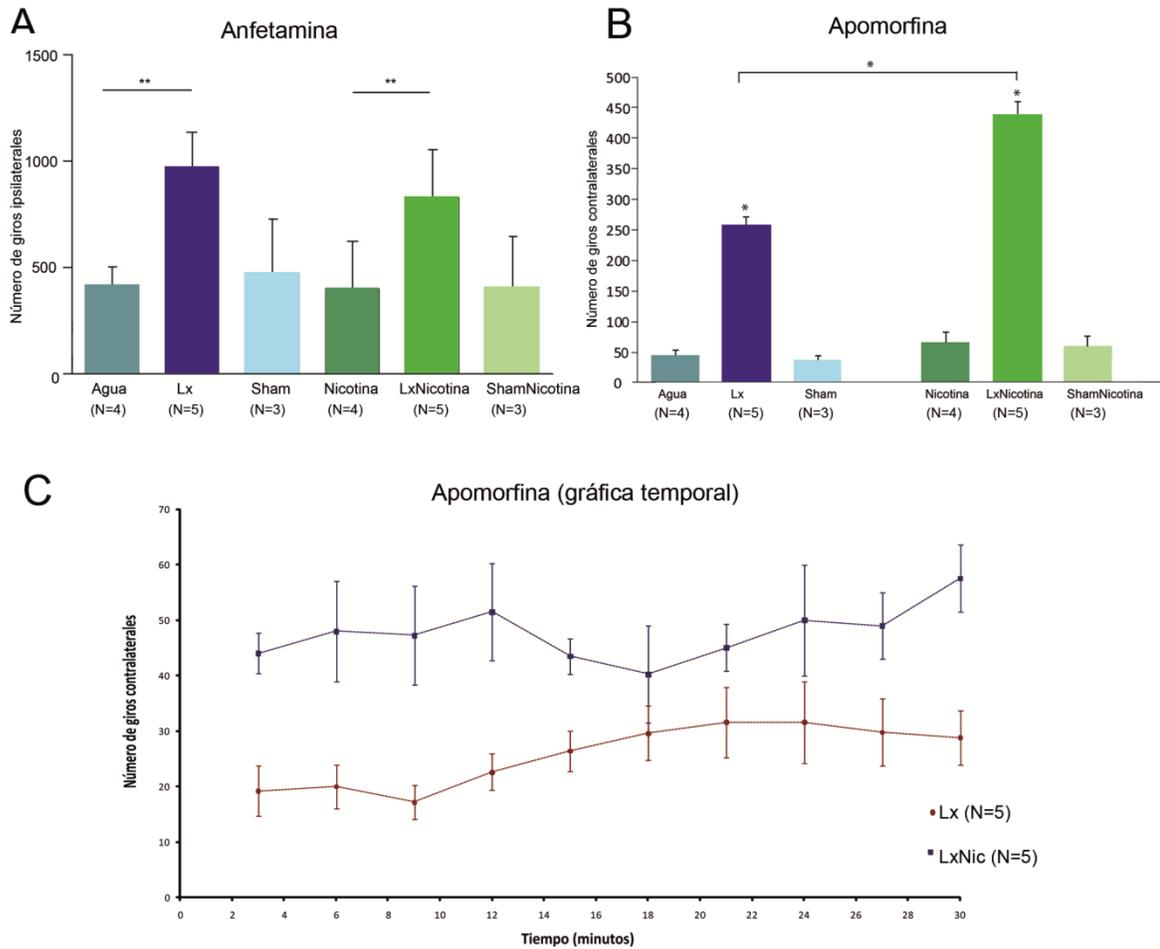


Figura 15. Gráfica del número de giros inducidos mediante agonistas dopaminérgicos. **A.** Muestra el número de giros ipsilaterales al lado lesionado inducidos con anfetamina. ** Señala las diferencias significativas utilizando T de Student ($p < 0.05$). **B.** Muestra el número de giros contralaterales al lado lesionado inducidos con apomorfina (2 mg/kg). * Señala las diferencias significativas utilizando ANOVA de un factor ($p < 0.01$). **C.** Muestra la gráfica temporal de la conducta de giro contralateral inducida con apomorfina de los grupos Lx y LxNic. El registro del número de giros fue realizado cada 3 minutos desde el inicio de la prueba durante 30 minutos.

4.2.2 APOMORFINA

El número de giros contralaterales e ipsilaterales se sometieron a prueba de hipótesis para corroborar si las medias de todos los grupos eran iguales o si existía diferencia significativa.

Se determinó la normalidad de los datos utilizando la prueba Shapiro-Wilks. Esta prueba nos indicó que el número de giros contralaterales de los grupos presentaban distribución normal (Tabla 2). Asimismo, para determinar la homogeneidad de varianza se utilizó la prueba de Levene, cuyo valor del estadístico resultó de 0.814 y el valor de $p=0.432$ (>0.05), aceptando la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas. Debido a lo anterior, se decidió utilizar un ANOVA de un solo factor y la prueba *post hoc* Bonferroni.

Test de Normalidad			
		Shapiro-Wilk	
		Estadístico	Sig. (p)
Giros a la Derecha (contralaterales al lado lesionado)	LxNic	.961	.785
	ShamNic	.990	.907
	Nic	.993	.974
	LxAgua	.897	.392
	ShamAgua	.982	.741
	Agua	.870	.297

Tabla 2. Muestra los datos obtenidos en el test de normalidad de los seis grupos. El análisis se realizó en el programa SPSS Statistics 17.0. Todos los grupos tienen un valor de $p > .05$.

El análisis ANOVA arrojó un valor F de 23.170 y un valor p de 0.000, por lo que se rechaza la hipótesis nula de que las medias de los grupos son iguales, aceptando la hipótesis alterna de que las medias son diferentes. Para corroborar cuáles eran los grupos cuyas medias eran diferentes, se utilizó el análisis *post hoc* Bonferroni. En dicho análisis se observó que los giros contralaterales (al lado derecho) de los grupos Lx y LxNic fueron significativamente diferentes al resto de los grupos y entre ellos (Tabla 3, Figura 15b).

Comparaciones múltiples. Bonferroni		
Grupo		Nivel de significancia (p) al nivel 0.05
LxNic	Nic	.000
	Agua	.000
	Lx	.004
	ShamNic	.000
	ShamAgua	.000
Lx	Nic	.014
	Agua	.006
	LxNic	.004
	ShamNic	.021
	ShamAgua	.010

Tabla 3. Muestra los datos obtenidos en la prueba *posthoc* Bonferroni del ANOVA realizado para los giros hacia la derecha (contralaterales al lado lesionado). El análisis se realizó en el programa SPSS Statistics 17.0. Todos los grupos tienen un valor de $p < .05$ al compararse con los grupos LxNic y Lx, así como la comparación entre estos dos grupos.

Asimismo, cuando se observa la gráfica temporal de la asimetría motora contralateral al lado lesionado (Figura 15c), de los animales hemiparkinsonianos sin tratamiento y con tratamiento de nicotina, se puede apreciar que en todo momento el número de giros registrados de los grupos lesionados es mayor en el grupo tratado con nicotina en comparación al grupo sin tratamiento.

En resumen, el tratamiento crónico con nicotina incrementó la asimetría motora producida por la estimulación de los receptores dopaminérgicos con la administración de apomorfina, en ratas hemiparkinsonianas.

4.3 EVALUACIÓN DE LA LESIÓN EN EL ESTRIADO Y EN LA SNC.

Como se puede observar en las fotografías (figura 16), las ratas lesionadas con 6-OHDA no presentaron tinción para la enzima TH en el estriado (figura 16A) ni en la SNC ipsilaterales al lado lesionado (Figura 16B), corroborando así la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y de sus proyecciones hacia el estriado. Los animales de los grupos lesionados que presentaban estas características fueron seleccionadas para las pruebas histológicas posteriores.

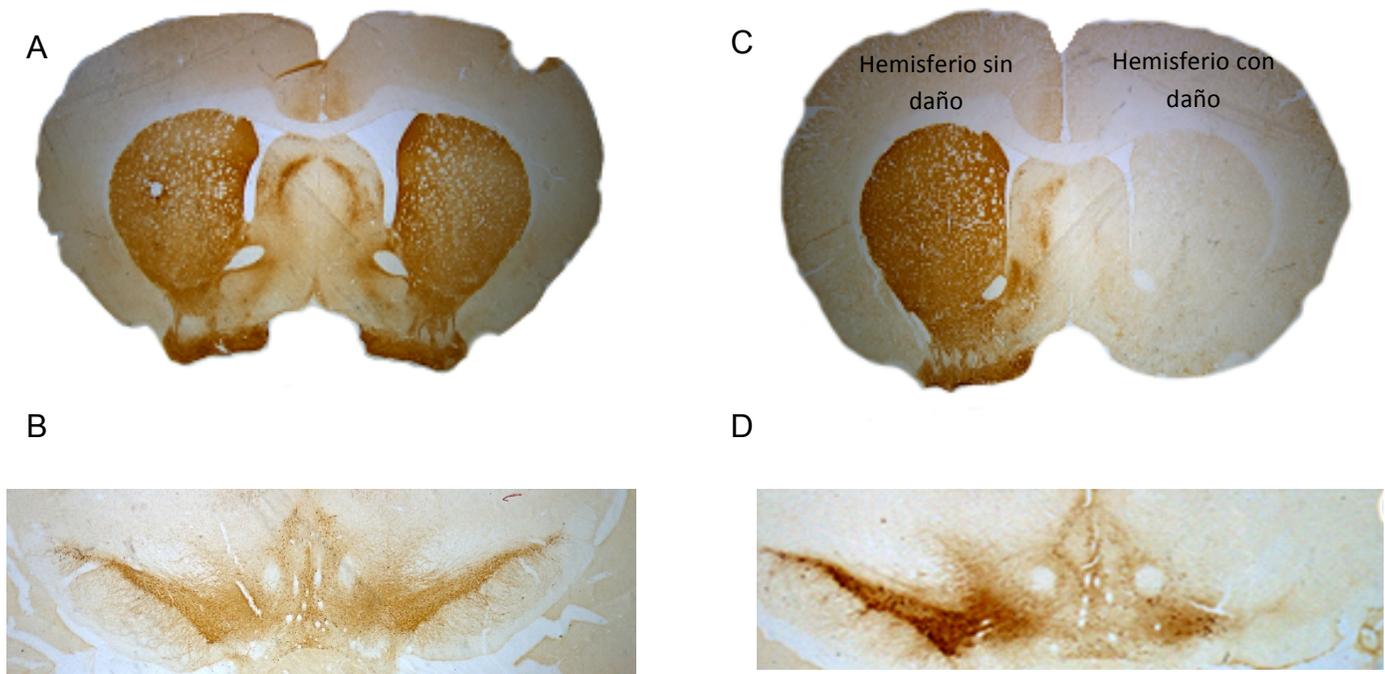


Figura 16. Inmunohistoquímica para TH en cortes coronales del estriado medial (A y C) y de la SNc (B y D). Quince días después de lesionar a los animales con la neurotoxina 6-OHDA (C y D) se observa la denervación completa del sistema DAérgico nigroestriatal ipsilateral (hemisferio izquierdo). En los animales no lesionados o del grupo Sham (A y B) las neuronas DAérgicas de la SNc (B) y sus proyecciones hacia el estriado (A) se encuentran teñidas en ambos hemisferios.

4.4 ACTIVACIÓN DE c-Fos EN EL ESTRIADO DORSAL

Para determinar si la nicotina inducía modificaciones en la actividad neuronal en los animales lesionados que nos pudieran explicar los cambios observados en la conducta de giro, se realizó la técnica de inmunofluorescencia para c-Fos.

4.4.1 ANFETAMINA

Los datos de los conteos de células c-Fos positivas en los animales inyectados con anfetamina, se analizaron con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Tabla 4), dicha prueba nos indicó que los datos presentaban una distribución normal.

Test de Normalidad			
		Shapiro-Wilk	
		Estadístico	Sig. (p)
c-Fos hemisferio derecho	Lx	.865	.283
	LxNic	.817	.057
	Agua	.909	.477
	Nic	.992	.970
	Sham	.824	.174
	ShamNic	.934	.502
c-Fos hemisferio izquierdo	Lx	.898	.380
	LxNic	.959	.806
	Agua	.883	.351
	Nic	.932	.608
	Sham	1.000	.978
	ShamNic	.991	.819

Tabla 4. Muestra los valores obtenidos en el test de normalidad de los seis grupos. El análisis se realizó en el programa SPSS Statistics 17.0. Todos los grupos tienen un valor de $p > .05$, indicando que los datos de los grupos se distribuyen de manera normal.

Posteriormente, se realizó la prueba de Levene, obteniendo un valor del estadístico de 2.792 y 0.503 para el hemisferio izquierdo y derecho respectivamente, y con un valor de p de 0.51 para el hemisferio izquierdo y 0.770 para el hemisferio derecho. Esto nos indicó que existe homogeneidad de varianzas entre los datos.

Una vez realizados los dos análisis anteriores, se utilizó un ANOVA de un factor para determinar si había diferencia o no en la expresión de c-Fos inducida con anfetamina en ambos hemisferios. El valor de F para el hemisferio izquierdo fue de 10.786 con un valor p de 0.000, mientras que para el hemisferio derecho el valor F fue de 7.476 y el valor p de 0.001. Por lo tanto, la expresión de c-Fos, en ambos hemisferios fue diferente entre los grupos.

Para determinar en qué grupos habían diferencias se utilizó la prueba *post hoc* Bonferroni. La prueba *post hoc* indicó que la expresión de c-Fos en el hemisferio lesionado (izquierdo) resultó significativamente menor en el grupo LxNic respecto a los grupos Agua ($p=0.010$), Nic ($p=0.000$) y ShamNic ($p=0.016$). Asimismo, la expresión de c-Fos en el hemisferio

lesionado fue menor en el grupo LxAgua (Figura 17) en comparación con los grupos Agua ($p=0.14$), Nic ($p=0.001$) y ShamNic ($p=0.019$). En el hemisferio no lesionado, la expresión de c-Fos fue mayor significativamente en los grupos tratados con nicotina (LxNic, Sham Nic y Nic) al compararlos con el grupo Agua ($p=0.02$, $p=0.04$ y $p=0.001$, respectivamente) y grupo Sham Agua ($p=0.024$, $p=0.039$ y $p=0.001$, respectivamente) (Figura 17).

Expresión de c-Fos en el estriado dorsal inducida con anfetamina

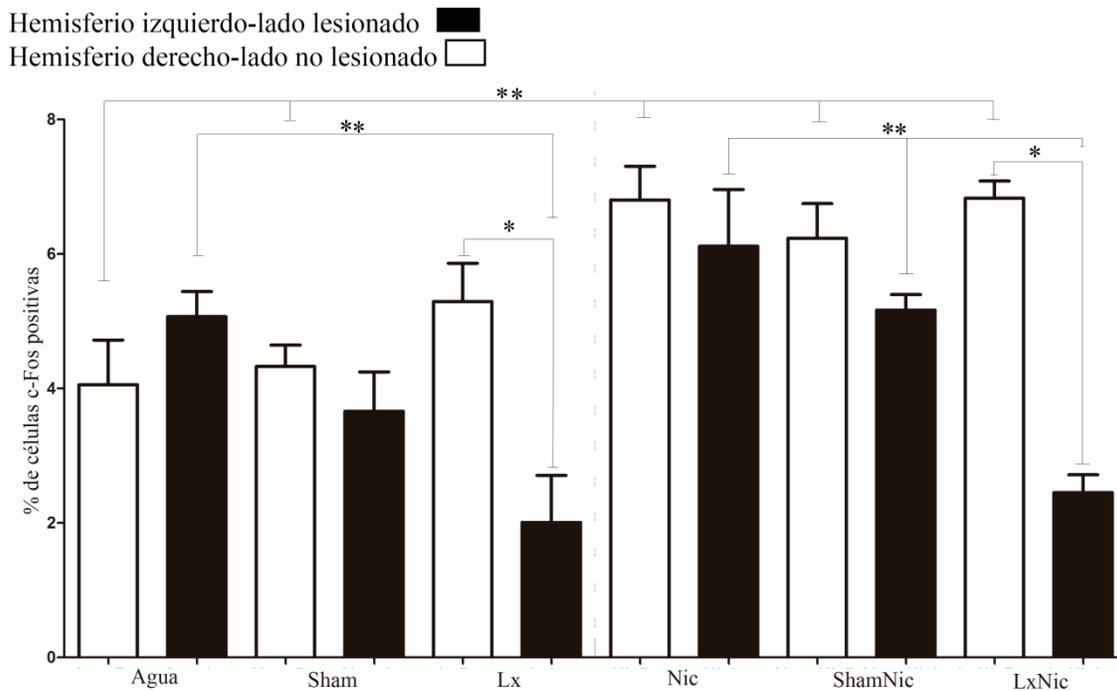


Figura 17. Gráfica del porcentaje de células positivas para c-Fos en el estriado dorsal de todos los grupos y de ambos hemisferios. **ANOVA, $p<0.05$. *T de Student. $P<0.05$. La expresión de c-Fos en el hemisferio lesionado resulto menor en el grupo LxNic vs Agua, esta comparación no se muestra en la gráfica.

Por otro lado se utilizó la prueba T de Student para muestras relacionadas para determinar si había o no diferencias significativas en la expresión de c-Fos entre ambos hemisferios de los grupos LxAgua y LxNic. El valor T para el grupo LxAgua (hemisferio derecho vs hemisferio izquierdo) fue de 3.645 y el valor p de 0.022, mientras que en el grupo LxNic (hemisferio derecho vs hemisferio izquierdo) el valor T fue de 11.854 y el valor p de 0.001.

Por lo tanto, en ambos casos hay una mayor expresión de c-Fos en el hemisferio no lesionado en comparación al hemisferio lesionado (Figura 17).

En resumen, el análisis estadístico indicó que la denervación dopaminérgica del estriado disminuyó la expresión de c-Fos al estimular la liberación de dopamina en el hemisferio lesionado. Por otro lado, la administración crónica de nicotina incrementó la expresión de c-Fos en condiciones normales, al estimular la liberación de dopamina. Asimismo, al inducir la denervación dopaminérgica en animales expuestos a nicotina crónica, la expresión de c-Fos incrementó en el estriado no desnervado al estimular la liberación de dopamina con anfetamina.

4.4.2 APOMORFINA

Se llevó a cabo el análisis de normalidad de los conteos celulares de células c-Fos positivas inducidas mediante la administración de apomorfina. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, obteniendo los valores de la Tabla 5, lo cual indicó que los datos presentaban una distribución normal.

Test de Normalidad			
Grupo		Shapiro-Wilk	
		Estadístico	Sig. (p)
c-Fos hemisferio derecho	Agua	.927	.579
	Nicotina	.754	.051
	Lx	.871	.272
	Sham	.897	.377
	LxNic	.844	.177
	ShamNic	.940	.528
c-Fos hemisferio izquierdo	Agua	.878	.331
	Nicotina	.757	.054
	Lx	.895	.385
	Sham	.804	.124
	LxNic	.894	.377
	ShamNic	.883	.333

Tabla 5. Muestra los valores obtenidos en el test de normalidad de los seis grupos y de cada hemisferio. El análisis se realizó en el programa SPSS Statistics 17.0. Todos los grupos tienen un valor de $p > .05$, indicando que los datos de los grupos se distribuyen de manera normal.

Adicionalmente, se realizó la prueba Levene para corroborar la homogeneidad de varianzas. La expresión de c-Fos para el hemisferio izquierdo obtuvo un valor de estadístico de 8.573 con significancia de 0.000, mientras que en el hemisferio derecho se obtuvo un estadístico de 6.635 con significancia de 0.001, por lo que se acepta la hipótesis de que la varianza de las muestras es diferente.

Debido a que los datos cumplían el supuesto de normalidad pero no el de homogeneidad de varianzas, se decidió utilizar la prueba T-Student de dos colas para muestras independientes, sin asumir homogeneidad de varianza en los casos cuyos valores de F y p (prueba de Levene) así lo indicaran (Tabla 6).

Grupo			Prueba Levene para homogeneidad de varianzas		Prueba T para igualdad de medias	
			F	Sig. (p)	t	Sig. de dos colas (p)
c-Fos hemisferio derecho (no lesionado)	Nicotina	Agua	3.07	0.13	-8.892	0
		Lx	0.538	0.487	-5.668	0.001
		Sham	1.206	0.322	-8.21	0
		LxNic	0.153	0.707	-0.426	0.683
		ShamNic	7.945	0.037	0.452	0.693
	Agua	Lx	8.084	0.025	0.874	0.423
		Sham	0.774	0.428	-1.628	0.164
		LxNic	2.082	0.192	5.965	0.001
		ShamNic	11.397	0.02	2.043	0.177
	Lx	Sham	4.949	0.89	-1.387	0.215
		LxNic	0.006	0.942	4.695	0.002
		ShamNic	8.79	0.025	1.851	0.198
	Sham	LxNic	0.975	0.362	5.653	0.001
		ShamNic	7.415	0.053	2.217	0.091
LxNic	ShamNic	7.197	0.036	0.566	0.624	
c-Fos hemisferio izquierdo (lesionado)	Nicotina	Agua	0.007	0.935	-7.33	0.001
		Lx	11.83	0.01	8.953	0.001
		Sham	3.476	0.121	-4.434	0.007
		LxNic	17.749	0.004	23.195	0
		ShamNic	2.243	0.194	0.156	0.882
	Agua	Lx	11.826	0.011	9.674	0.001
		Sham	5.097	0.075	-0.163	0.877
		LxNic	18.018	0.004	24.618	0
		ShamNic	3.226	0.132	4.868	0.005
	Lx	Sham	7.355	0.035	-9.58	0.001
		LxNic	3.201	0.111	2.717	0.026
		ShamNic	7.588	0.033	-8.844	0.001
	Sham	LxNic	9.338	0.022	23.574	0
		ShamNic	0.089	0.78	3.3	0.03
LxNic	ShamNic	10.033	0.19	-22.361	0	

Tabla 6. Muestra los valores obtenidos en la prueba de homogeneidad de varianzas de cada comparación utilizando la prueba Levene. Asimismo, muestra los valores obtenidos de la comparación entre las medias de la prueba estadística T-Student. Los valores *t* que se seleccionaron de cada comparación, fueron elegidos en función del valor obtenido en la prueba Levene, asumiendo varianzas homogéneas cuando el valor *p* de la prueba Levene fue mayor a 0.05, o no asumiendo varianzas homogéneas cuando fue menor a 0.05. El análisis se realizó en el programa SPSS Statistics 17.0.

Como se observa en la tabla 6 y en la figura 18, la prueba T-Student mostró que los la expresión de c-Fos incrementó significativamente en el hemisferio no lesionado (derecho) de los grupos: Nic (*vs* Agua, Lx y Sham) y LxNic (*vs* Agua, Lx y Sham). Mientras que en el hemisferio lesionado (izquierdo), se observó un incremento significativo en la expresión de c-Fos de los grupos: Lx (*vs* Agua y Sham), Nic (*vs* Agua y Sham), LxNic (*vs* Agua, Lx, Sham, Nic y ShamNic) y ShamNic (*vs* Agua y Sham).

Por otro lado, con el fin de determinar si había diferencia significativa entre el hemisferio lesionado *vs* el hemisferio no lesionado de los grupos Lx y LxNic, se realizó la prueba T para una sola muestra, obteniendo los valores de la tabla 7, que indican que en ambos grupos la expresión de c-Fos inducida al estimular los receptores dopamiérgicos, incremento significativamente en el hemisferio lesionado.

Prueba T para una muestra			
Grupo		t	Sig. Bilateral (p)
Lx	c-Fos der (hemisferio no lesionado)	9.833	0.001
	c-Fos izq (hemisferio lesionado)	10.473	0
LxNic	c-Fos der (hemisferio no lesionado)	14.474	0
	c-Fos izq (hemisferio lesionado)	26.337	0

Tabla 7. Expresión de c-Fos en el hemisferio lesionado *vs* no lesionado. Muestra los valores obtenidos en la prueba T de Student para una sola muestra. El análisis determinó que la expresión de c-Fos entre el hemisferio lesionado y no lesionado, es diferente significativamente, en los grupos Lx y LxNic. El análisis se realizó en el programa SPSS Statistics 17.0.

En resumen, los datos indican que la administración crónica de nicotina incrementó la expresión de c-Fos inducida por la estimulación de receptores dopaminérgicos, en el estriado. Asimismo, la denervación dopaminérgica en el estriado, incrementó la expresión de c-Fos en el hemisferio afectado, el cual fue mayor cuando los animales fueron tratados con nicotina de manera crónica, previo a la denervación dopaminérgica.

Expresión de c-Fos en el estriado dorsal inducido con apomorfina

Hemisferio izquierdo - lado lesionado ■
 Hemisferio derecho - lado no lesionado □

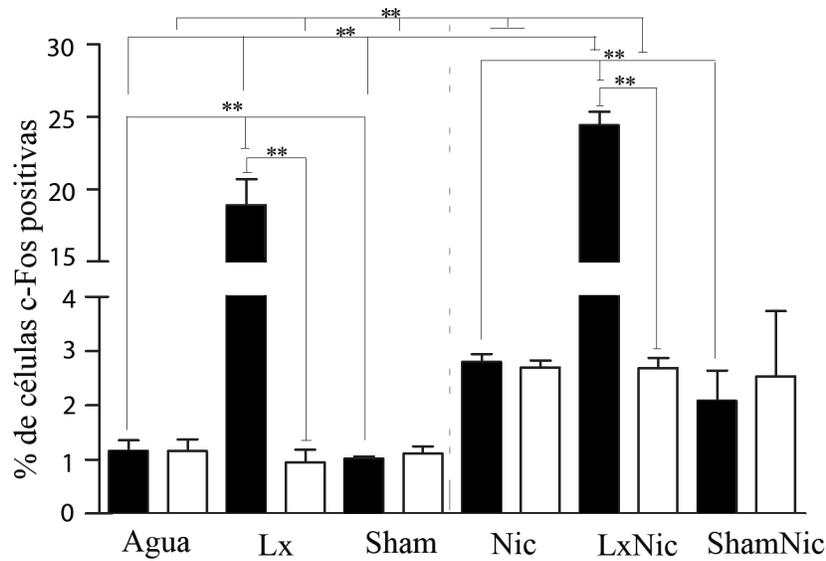


Figura 18. Resultados de la expresión de c-Fos inducida con apomorfina. Muestra la expresión de c-Fos en el estriado dorsal de todos los grupos. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba T-Student ** $p < 0.05$. Como se observa en la gráfica, la administración crónica de nicotina incrementa la expresión de c-Fos en ambos hemisferios. Asimismo, la lesión con 6-OHDA incrementa la expresión en el hemisferio lesionado (izquierdo), la cual es mayor en el caso del grupo que consumió nicotina previo a la lesión.

4.3 ACTIVACIÓN DE c-Fos EN POBLACIONES ESTRIATALES ESPECÍFICAS.

Para determinar si existían poblaciones neuronales específicas dentro del estriado a las cuales el tratamiento crónico de nicotina afectó preferentemente, se realizó la colocalización con marcadores específicos para interneuronas FS, LTS y las NEMs.

Se contó el número de células positivas para parvalbúmina (interneuronas FS) y somatostatina (interneuronas LTS), además del número de éstas que colocalizaban con c-Fos para determinar cuántas células de estas poblaciones neuronales se encontraban activas (Figuras 19A-B y 20). En el caso de las NEMs, únicamente se utilizó el marcador sustancia P (NEM de la vía directa, D₁), debido a que la inmunofluorescencia para encefalina (NEM de la vía indirecta, D₂), no pudo ser estandarizada a pesar de realizar varias pruebas con

diferentes parámetros. Asimismo, el número de células totales positivas para sustancia P no fue determinado, debido a la gran densidad de estas células, sin embargo, se contó el número de células c-Fos positivas que colocalizaban con sustancia P (Figuras 19C y 20). Este análisis únicamente se llevó a cabo en el grupo que fue estimulado con apomorfina debido a que los cambios en la expresión de c-Fos y en la conducta fueron más prominentes.

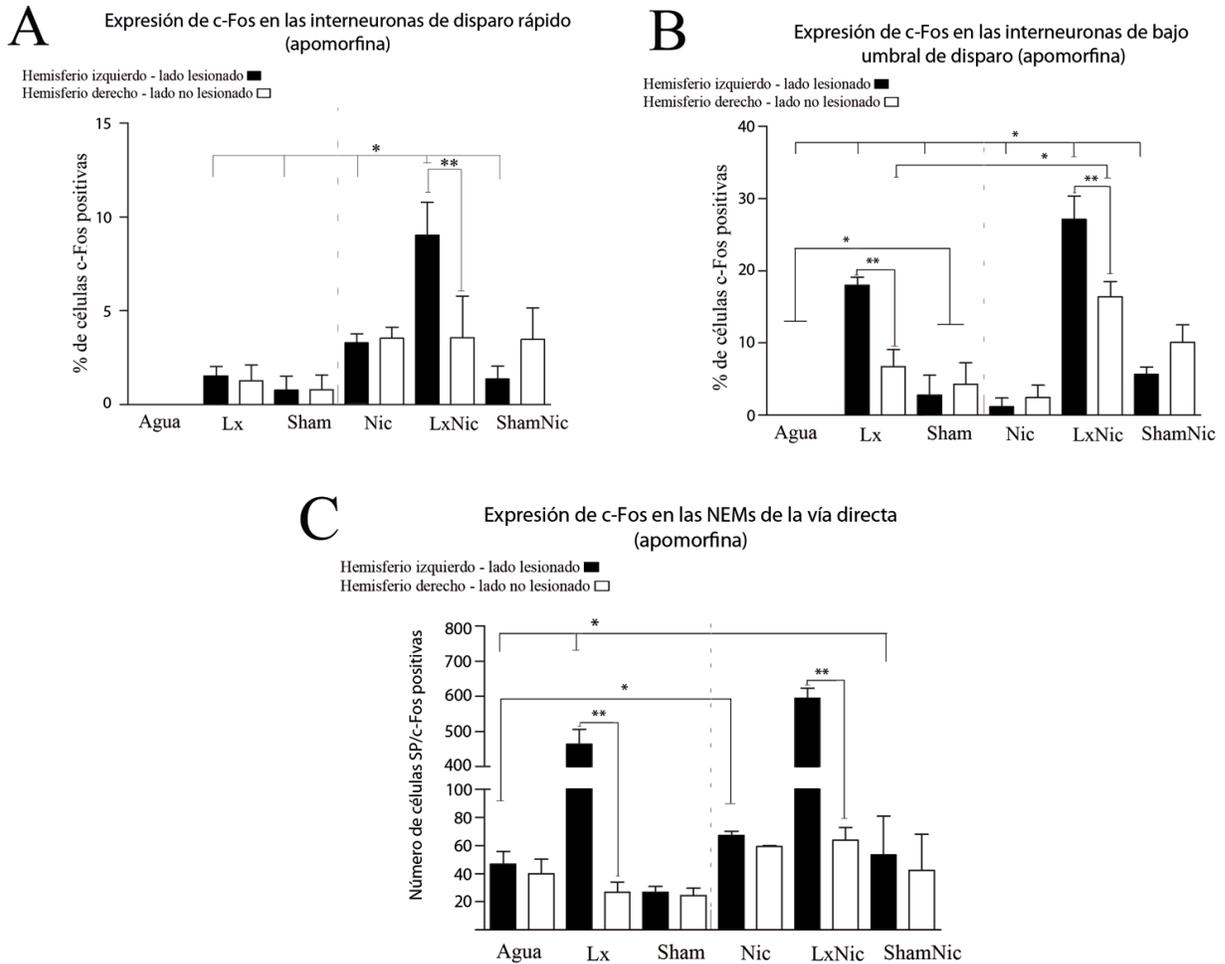


Figura 19. A, gráfica del porcentaje de colocación de las interneuronas FS con c-Fos. B, gráfica del porcentaje de colocación de las interneuronas LTS con c-Fos. C, gráfica del número de NEMs de la vía directa (positivas a sustancia P) que colocalizaban con c-Fos. *ANOVA $p < 0.05$, **T de Student $p < 0.05$.

Los datos fueron analizados con una ANOVA debido a que forman parte de una distribución normal, exceptuando los grupos Sham y ShamNic. Como prueba *pos hoc* se utilizó Bonferroni en el caso de los datos cuya varianza fuera homogénea y Games-Howell cuando dicho criterio no se cumplía. También se utilizó la prueba T de Student para analizar si había diferencia significativa entre el lado lesionado y no lesionado de los grupos Lx y LxNic.

En condiciones normales, es decir sin lesión y sin tratamiento de nicotina, la expresión de c-Fos en las interneuronas FS es similar entre ambos hemisferios. Como se observa en la gráfica 19A, la lesión con la neurotoxina no incrementa significativamente el número de interneuronas FS positivas para c-Fos en ambos hemisferios. Únicamente los animales hemiparkinsonianos tratados con nicotina presentaron un incremento significativo de células FS positivas para c-Fos en el hemisferio lesionado al compararlo con el resto de los grupos ($p < 0.05$) y con el hemisferio no lesionado del mismo grupo ($p < 0.05$).

En cuanto a las interneuronas LTS (que expresan somatostatina), en condiciones normales la expresión de c-Fos en esta población neuronal es similar entre ambos hemisferios. Cuando se lesiona el sistema dopaminérgico con 6-OHDA, la colocalización de c-Fos incrementa significativamente en el hemisferio lesionado del grupo Lx ($p < 0.05$, Figura 19B). Asimismo esta diferencia entre el hemisferio lesionado y no lesionado se observa en las ratas lesionadas con tratamiento crónico de nicotina (LxNic), siendo el hemisferio lesionado el que tiene mayor expresión de c-Fos. En los animales hemiparkinsonianos tratados con nicotina, el número de células somatostatina/c-Fos positivas es mayor significativamente en ambos hemisferios, con un mayor número de células colocalizando en el hemisferio lesionado en comparación al hemisferio lesionado de las ratas con daño pero sin tratamiento de nicotina (Lx) y en comparación con el grupo ShamNic y Sham($p < 0.05$).

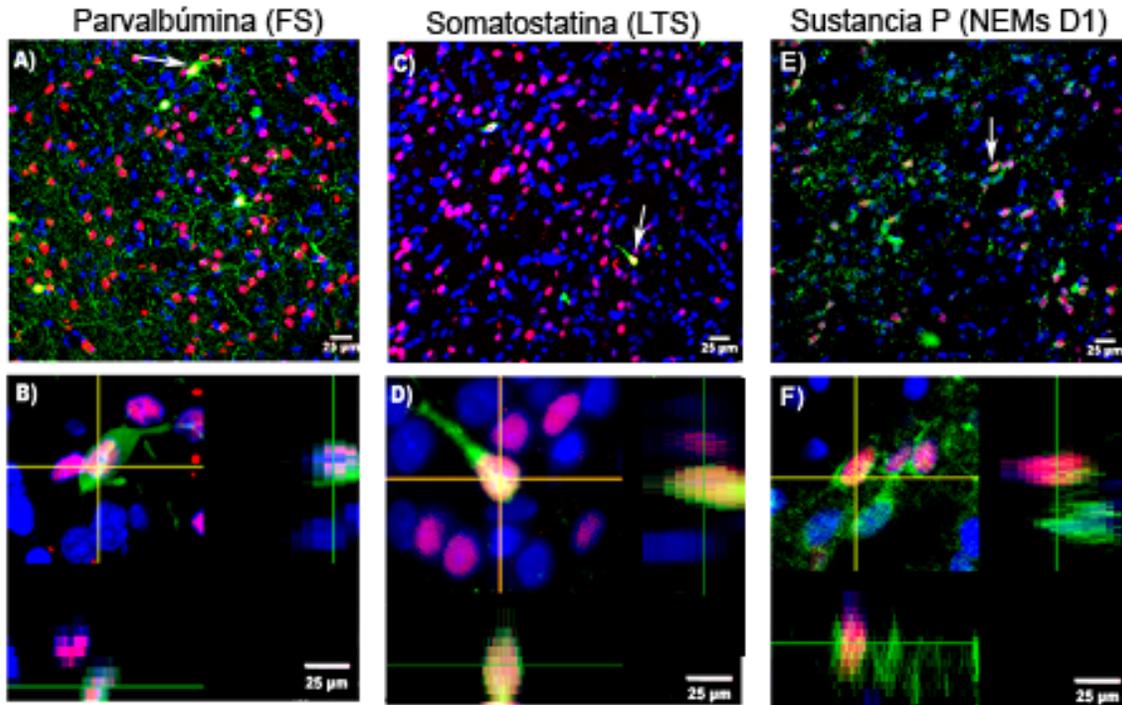


Figura 20. Fotografías tomadas en microscopio confocal de la expresión de c-Fos y su colocalización con diversos fenotipos celulares dentro del estriado desnervado. A, C, E reconstrucción en z de una región del estriado dorsal con un objetivo de 40x. B, D, F vista ortogonal de las células señaladas con una flecha tomada con un zoom de 7x para corroborar la colocalización de los tres canales (azul, verde y rojo). A y B, Parvalbúmina (verde). C y D, somatostatina (verde), E y F, Sustancia P (verde). A-F c-Fos (rojo) y DAPI (azul).

En condiciones normales la expresión de c-Fos en las NEMs de la vía directa fue similar entre ambos hemisferios. Al inducir la denervación dopaminérgica, el número de células c-Fos positivas de ésta vía incrementó significativamente ($p < 0.05$; Figura 19C), en el hemisferio lesionado mientras que en el hemisferio no lesionado se mantuvieron los niveles de colocalización como en los grupos no lesionados. Asimismo en las ratas tratadas con nicotina y lesionadas se incrementó significativamente en ambos hemisferios el número de células Sustancia P/c-Fos positivas en comparación a las ratas lesionadas sin tratamiento de nicotina ($p < 0.05$).

En conjunto, estos resultados nos indican que el tratamiento con nicotina en animales lesionados incrementó la actividad celular en los tres tipos neuronales analizados, y por lo tanto podría estar relacionado con los cambios conductuales observados en los animales tratados con nicotina.

CAPITULO 5: DISCUSIÓN

Los GB son parte del circuito del prosencéfalo involucrado en la selección de la acción (Wichmann y DeLong, 2003). Las alteraciones del circuito de los GB resultan en diversas alteraciones del movimiento, desde las relacionadas con hipocinesia como la EP y las relacionadas con hipercinesia como la distonía o coreas (Mink, 2003).

Estudios epidemiológicos muestran que los fumadores tienen 50% menos incidencia de padecer la enfermedad de Parkinson que personas no fumadoras (Gorell *et al.*, 1999, Hernan *et al.*, 2001, Driver *et al.*, 2009). Se ha observado que la nicotina, el principal componente del tabaco, mejora algunos de los síntomas motores y cognitivos en los pacientes con EP (Fagerstrom *et al.*, 1994, Villafane *et al.*, 2007). Sin embargo, los efectos de la administración a largo plazo de la nicotina y su relación en la regulación de eventos moleculares y celulares dentro del circuito de los GB no han sido esclarecidos.

El estriado es considerado el principal núcleo integrador de la información cortical y talámica de los GB. Una de sus características es su alta inervación dopaminérgica proveniente de la SNc (Bolam *et al.*, 2000), cuya entrada es crítica para el control del movimiento asociado a los GB. Por lo tanto, este trabajo se enfocó en el estudio de los efectos del tratamiento crónico de nicotina dentro del estriado, en condiciones normales y cuando se reduce la entrada dopaminérgica en ésta estructura.

5.1 BASES CELULARES DE LA CONDUCTA DE GIRO

5.1.1 Conducta motora y actividad neuronal asociadas a la disminución de dopamina en el estriado

El primer y segundo objetivos del presente trabajo fue determinar el efecto de la administración crónica de nicotina sobre la conducta motora inducida con agonistas dopaminérgicos en animales hemiparkinsonianos, así como determinar si la actividad neuronal dentro del estriado se modificaba. Para ello es importante comprender qué sucede

durante dicha conducta en animales sin tratamiento previo de nicotina, y posteriormente qué sucede cuando los animales son tratados con nicotina.

En el modelo animal de 6-OHDA de la EP, se utiliza la prueba conductual conocida como conducta de giro inducida con agonistas dopaminérgicos (anfetamina y apomorfina). En condiciones sin daño, la administración de estos agonistas no induce conducta de giro, al contrario de los animales hemiparkinsonianos (Figura 15).

Al administrar anfetamina se observa una menor actividad neuronal (observada mediante la expresión de c-Fos) dentro del estriado desnervado, al compararlo con el estriado intacto. Esto corrobora la explicación de la conducta de giro, la cual sugiere un desbalance en la actividad de la vía directa e indirecta en ambos hemisferios. Al liberar dopamina en el estriado sano se promueve la despolarización de las NEMs de la vía directa (D_1), y la liberación de GABA sobre los núcleos de salida (SNr y GP interno), facilitando el movimiento por la falta de inhibición del tálamo. Sin embargo, dentro del estriado desnervado no se libera dopamina por la falta de terminales provenientes de la SNc. Por lo que dentro de este hemisferio, la vía que se encuentra más activa es la vía indirecta, debido a que la dopamina no inhibirá a las NEMs de esta vía (receptores dopaminérgicos de tipo D_2), dando como resultado la inhibición del tálamo y por lo tanto no hay movimiento.

Por otro lado, uno de los fenómenos asociados a la falta de entrada dopaminérgica dentro del estriado, es el aumento de receptores dopaminérgicos dentro de esta estructura junto con un aumento en la sensibilidad de éstos receptores. La administración de agonistas que actúen directamente sobre los receptores dopaminérgicos, como la apomorfina, induce mayor expresión de c-Fos en el estriado desnervado, corroborando que la denervación dopaminérgica induce cambios en la actividad sináptica dentro del estriado debido al aumento de receptores dopaminérgicos y probablemente a otros cambios relacionados con la falta de dopamina.

5.1.2 Conducta motora y actividad neuronal asociados a la administración crónica de nicotina en la EP

Como se mencionó anteriormente, la nicotina tiende a disminuir el número de giros inducidos con anfetamina en ratas hemiparkinsonianas. Por resultados de nuestro laboratorio, obtenidos a la par de este proyecto, sabemos que esa disminución es significativa cuando se analiza un mayor número de animales (García-Montes JR *et al.*, 2012).

Una de las explicaciones de la disminución de la conducta de giro inducida con anfetamina, es que la nicotina tiene un efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Esta explicación se sustenta por los resultados observados en ciertos protocolos de administración de nicotina, en los cuales la nicotina previene el daño celular como la degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal inducida por la neurotoxina MPTP (Quik y Jayarasasingam 2000). Asimismo, se ha observado que el tratamiento agudo de nicotina previene la muerte excitotóxica de las células a través de cascadas de señalización relacionadas con la entrada de Ca^{+} a la célula (Mudó *et al.*, 2007). Sin embargo, bajo el protocolo utilizado en el presente trabajo, así como en estudios desarrollados en nuestro laboratorio (García-Montes *et al.*, 2012), no se observó que el tratamiento crónico de nicotina previniera la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc inducida por la neurotoxina 6-OHDA (Figura 16). Estos datos sugieren que los efectos en la conducta motora observados, puedan ser debidos a cambios asociados con el circuito de los GB.

En la búsqueda del mecanismo asociado a la disminución de la conducta de giro inducida con anfetamina se observó que la nicotina disminuye la liberación de dopamina dentro del estriado intacto en ratas hemiparkinsonianas (García-Montes JR *et al.*, 2012). Al disminuir la dopamina, el desbalance de su liberación entre ambos hemisferios es menor. Sin embargo, la expresión de c-Fos en el estriado intacto, inducida con anfetamina, es mayor en los animales tratados con nicotina (Figura 17). Asimismo, el incremento en la actividad puede deberse a un aumento en la afinidad a la dopamina, inducido por la nicotina, como se ha observado cuando se administra nicotina de manera aguda (Gregorio *et al.*, 2009) y bajo

el protocolo utilizado en el presente trabajo (García-Montes *et al.*, 2012). El incremento en la actividad podría ser en poblaciones específicas, como interneuronas GABAérgicas, que contrarresten el desbalance en la activación de las vías del movimiento.

En cuanto a la apomorfina, el número de giros incrementa en ratas tratadas con nicotina. Existe gran relación entre los receptores dopaminérgicos y nicotínicos dentro del estriado (Nashmi *et al.*, 2007; Quarta *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2009). Se ha observado que la administración aguda de nicotina produce cambios en la afinidad del complejo ligando-receptor, haciendo a los receptores dopaminérgicos más afines al ligando (Gregorio *et al.*, 2009). Esto ha sido corroborado bajo nuestro protocolo de administración, donde la administración crónica de nicotina indujo un cambio de afinidad de los receptores dopaminérgicos (García-Montes *et al.*, 2012), lo cual podría provocar una mayor respuesta ante un agonista que actúa directamente sobre receptores dopaminérgicos.

En condiciones normales, la apomorfina no induce expresión de c-Fos en el estriado, como se ha observado en otros trabajos (Cenci *et al.*, 1992) y en el presente. Sin embargo, cuando las fibras dopaminérgicas provenientes de la SNc son eliminadas, disminuyendo la dopamina liberada en el estriado y aumentando los receptores dopaminérgicos en esta región, se produce un incremento significativo en la expresión de c-Fos en comparación al estriado sin daño. La nicotina incrementó la expresión del gen de expresión temprana en ambos hemisferios, lo cual correlaciona con el aumento en la conducta de giro (Figura 18).

Estas observaciones son importantes debido a que la apomorfina es una droga utilizada para evitar los periodos On-Off inducidos por el tratamiento de L-DOPA (Factor *et al.*, 2004). Por lo que la nicotina o agonistas de nAChR representan un posible tratamiento en conjunto con bajas dosis de L-DOPA y apomorfina, puesto que sensibiliza los receptores dopaminérgicos obteniendo una mayor respuesta a agonistas dopaminérgicos.

5.2 MICROCIRCUITERIA DEL ESTRIADO

Los cambios en la expresión de c-Fos inducida mediante la administración de apomorfina, pueden estar asociados al aumento de la conducta de giro observada. Sin embargo, es

importante entender en qué poblaciones neuronales se da dicho cambio de actividad. Para ello nos planteamos el tercer objetivo del presente trabajo, que fue determinar si la administración crónica de nicotina modula la actividad de poblaciones neuronales estriatales específicas que pueda explicar la conducta observada.

La microcircuitaría del estriado consiste principalmente de neuronas de tipo GABAérgico. Las NEMs reciben aferencias GABAérgicas desde las interneuronas que se encuentran dentro del estriado (Benet y Bolam, 1994), además de hacer conexiones entre ellas mismas, con mayor prevalencia en las NEMs de la vía indirecta (Taverna *et al.*, 2008). Sin embargo, se piensa que la conectividad GABAérgica entre las NEMs tiene funciones distintas a la conectividad GABAérgica proveniente de las interneuronas estriatales, siendo ésta última inhibición de tipo *feedforward* después de una activación cortical (Mallet *et al.*, 2005).

5.2.1 Cambios en la modulación de entrada y salida: Interneuronas en el estriado

Dentro de los diversos tipos de interneuronas estriatales se encuentran las interneuronas FS y las interneuronas LTS, ambas de tipo GABAérgico. En el presente trabajo se analizaron estas dos poblaciones, con el fin de determinar en qué estirpe neuronal se incrementa la expresión de c-Fos que pueda influir en los cambios conductuales observados.

Las interneuronas FS reciben aferencias excitatorias desde la corteza así como inhibitorias de las NEMs y del GP, además de colinérgicas de las interneuronas colinérgicas (Bolam y Bennett, 1995). Representan la mayor inhibición de tipo *feedforward* hacia las NEMs de ambas vías (directa e indirecta).

Cuando los niveles de dopamina incrementan de manera aguda, se afecta la excitabilidad y propiedades sinápticas de las interneuronas FS. Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos cuando la dopamina disminuye de manera crónica, como sucede en la EP. En el presente trabajo se demostró que el tratamiento crónico de nicotina induce cambios que

generan un aumento en el número de interneuronas FS activas, dentro del estriado desnervado (Figura 19A).

Las interneuronas FS inhiben a las NEMs vecinas a través del neurotransmisor GABA, sin embargo, aún no se conoce si estas células tienen alguna preferencia o bajo qué circunstancias actúan principalmente sobre una u otra vía (directa o indirecta), aunque se ha observado que hay una preferencia sobre las NEMs de la vía directa (Gittis *et al.*, 2010).

Se piensa que el principal papel del tipo de inhibición que ejercen (*feedforward*) es el prevenir la descarga de las NEMs después de una entrada excitatoria proveniente de corteza, pero también puede ser efectiva en sincronizar la salida de las NEMs atrasando la descarga sin silenciarlas completamente (Koós y Tepper, 1999).

Las NEMs reciben miles de entradas excitatorias (10 000-15 000) (Wilson, 1988) y únicamente reciben entradas inhibitorias provenientes de 4 a 27 interneuronas FS (Koós y Tepper, 1999). A pesar de esto, la excitación y la inhibición se mantienen en balance a través de estas entradas. Esto puede deberse a que las interneuronas FS tienen tasas de disparo mucho más rápidas que las corticales (10-100Hz, >10Hz respectivamente) (Kock *et al.*, 2007; Berke *et al.*, 2004; 2008), además de responder más rápido a las entradas excitatorias corticales que las NEMs (Parthasarathy y Graybiel, 1997; Ramanathan *et al.*, 2002; Mallet *et al.*, 2005); permitiendo que un pequeño número de interneuronas FS mantenga el balance de un gran número de entradas excitatorias corticales. Por lo que un mayor número de interneuronas FS activas podría estar compensando la falta de dopamina, ejerciendo un mayor control sobre el balance en la activación de una u otra vía.

Además de las interneuronas FS, nosotros analizamos las interneuronas LTS positivas a somatostatina. Este grupo de interneuronas constituyen poco menos del 1% del total de neuronas del estriado (Rymar *et al.*, 2004). Reciben entradas excitatorias de la corteza y del tálamo, y GABAérgicas de las aferencias del GP (Bolam y Bennett, 1995).

En ratas hemiparkinsonianas el número de interneuronas LTS activas incrementó en el hemisferio desnervado. Asimismo, hubo mayor número de éstas activas en ratas hemiparkinsonianas tratadas con nicotina en ambos hemisferios, por lo que el tratamiento crónico de nicotina y la posterior denervación dopaminérgica ejercen cambios sinérgicos en la activación de esta población neuronal (Figura 19B).

El papel que juega esta población celular no ha sido determinado aún, sin embargo, se conoce que forman parte del tipo de inhibición *feedforward* dentro de la microcircuitaria estriatal, pero en menor medida comparándolas con las interneuronas FS. Es importante señalar que en esta población neuronal fue donde la nicotina tuvo un mayor efecto, pudiendo estar relacionada con la disminución de los efectos no deseados cuando se administra nicotina, provocados por el consumo a largo plazo de L-DOPA en los pacientes con EP.

5.2.2 La salida de la información dentro del estriado: NEMs de la vía directa

La expresión de c-Fos en las NEMs de la vía directa (receptor D₁, de tipo excitatorio), aumentó significativamente en el hemisferio desnervado así como en el de ratas hemiparkinsonianas tratadas con nicotina, con mayor número de células activas en este último grupo comparado con el primero (Figura 20C). Asimismo, el tratamiento de nicotina *per se* incrementó significativamente el número de células activas de la vía directa, sólo en uno de los hemisferios (Figura 19C).

Se ha propuesto desde hace algunas décadas que los síntomas motores de la EP derivan de una mayor actividad de la vía indirecta en comparación con la vía directa (Albin, 1989; DeLong, 1990). Se ha observado que la activación de las NEMs de la vía indirecta (D₂) en el estriado, suprime el movimiento, y que las alteraciones motoras presentes en ratones hemiparkinsonianos pueden ser parcialmente restauradas por la activación de las NEMs de la vía directa (D₁) (Kravitz *et al.*, 2010). Por lo que cambios en la actividad de una u otra vía dentro del estriado conllevan a alteraciones generalizadas a nivel de los GB.

Como se ha mencionado anteriormente, la disminución de dopamina dentro del estriado provoca un aumento en el número de receptores dopaminérgicos e hipersensibilidad en estos receptores, dentro de ésta estructura. Al estimular directamente los receptores dopaminérgicos, se observa una mayor actividad de la vía directa en el hemisferio desnervado probablemente por el incremento de los receptores. Sin embargo, en las ratas tratadas con nicotina hay una mayor actividad, por lo que la nicotina debe estar generando cambios en la afinidad del receptor dopaminérgico D₁ que provoquen una mayor respuesta ante el agonista, como ha sido observado en el tratamiento agudo de nicotina (Gregorio *et al.*, 2009).

El aumento del número de células activas de la vía directa al estimular los receptores dopaminérgicos, inducido mediante el tratamiento crónico de nicotina, podría deberse a que la administración prolongada de nicotina induce cambios en la afinidad del receptor dopaminérgico. Recientemente, se ha corroborado dentro del laboratorio, que el tratamiento crónico de nicotina incrementa la afinidad del receptor D₁ lo cual correlaciona con el incremento en la actividad antes mencionado (García-Montes *et al.*, 2012).

Otra posible explicación es que los nAChR son moduladores de la liberación de dopamina dentro del estriado, facilitando su liberación desde las terminales dopaminérgicas (Calabresi, 2000; Xiao *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha observado que la administración crónica de nicotina aumenta la expresión del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en las terminales dopaminérgicas dentro del estriado, lo que incrementando la liberación de dopamina desde las terminales dopaminérgicas en el estriado (Xiao *et al.*, 2009).

El cambio en la afinidad del receptor D₁ probablemente sea más prominente cuando se induce la denervación nigroestriatal, debido al fenómeno de hipersensibilidad por denervación. Asimismo, la lesión del sistema nigroestriatal disminuye algunos subtipos de receptores nicotínicos, por lo que se sugiere que, además de la denervación dopaminérgica al estriado, la dopamina liberada por la actividad nicotínica también se ve afectada en ratas hemiparkinsonianas sin tratamiento crónico de nicotina (Quik *et al.*, 2003), mientras que en

ratas tratadas con nicotina se indujeron cambios previos a la denervación como el aumento de nAChR (Quik *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2009).

Finalmente, como antes se mencionó, la inhibición *feedforward* ejercida por las interneuronas FS podría tener una preferencia sobre las NEMs de la vía directa (Gittis *et al.*, 2011), sin embargo, se debe tomar en cuenta las observaciones de que la falta de dopamina en el estriado genera una reorganización del objetivo de inhibición ejercida por este tipo celular incrementando selectivamente las conexiones de las interneuronas FS sobre las NEMs de la vía indirecta (Gittis *et al.*, 2011).

C A P I T U L O 6: CONCLUSIÓN

El estriado y en general los GB, son una estructura compleja y sumamente plástica. La microcircuitaria estriatal es a su vez una intrincada red de conexiones que son modificadas por procesos externos como el fumar tabaco. En el presente trabajo se determinó que la administración crónica de nicotina tuvo efectos sobre la conducta de giro en animales hemiparkinsonianos, inducida con agonistas dopaminérgicos (anfetamina y apomorfina), siendo más prominente cuando se estimula directamente los receptores dopaminérgicos al administrar apomorfina.

Asimismo, se observó que la administración crónica de nicotina modifica la activación de diversos tipos neuronales dentro del estriado. Observamos que modifica la activación de las interneuronas GABAérgicas (FS y LTS), con un mayor efecto sobre las interneuronas LTS. Ambos tipos de interneuronas se encargan de modular la actividad dentro esta estructura y ejercer inhibición de tipo *feedforward* sobre las NEMs para modular la actividad de la vía directa y la vía indirecta. Asimismo, observamos que en el estriado sin dopamina, la actividad de las NEMs de la vía directa se encuentra incrementada, lo cual se ve favorecido por la administración de nicotina. Es importante señalar que la activación de la vía directa inhibe la activación de la vía indirecta lo cual podría favorecer la ejecución del movimiento (Albin, 1989; Taverna *et al.* 2008; Kravitz *et al.*, 2010).

La importancia de lo anterior radica en que comprender los cambios generados por algún estímulo dentro de este circuito y el observar que es altamente plástico, nos abre las posibilidades de crear estrategias terapéuticas alternas enfocadas a nivel de microcircuitos. Es decir, modificar las conexiones ejercidas por las interneuronas estriatales, las cuales modulan las entradas y salidas de este circuito, para así restablecer en última instancia las alteraciones conductuales que imposibilitan una vida normal para el paciente con EP y en general alguna alteración de tipo motora relacionada con los GB. Asimismo, la nicotina o agonistas de nAChR representan un posible tratamiento para la EP, que puede ser utilizado en conjunto con otros tratamientos, como bajas dosis de L-DOPA y agonistas de receptores dopaminérgicos, para así prolongar el tiempo de mejoría de los síntomas motores.

Finalmente, nuestros resultados demuestran que a pesar de que estudios epidemiológicos observan una baja incidencia de la EP en personas fumadoras, dichos estudios probablemente estén mal interpretados. Proponemos que la nicotina, más que prevenir la aparición de la EP, puede estar compensando los efectos de la disminución de dopamina dentro del estriado, a través de modificaciones funcionales por la administración crónica de nicotina, como por ejemplo, el incremento en la afinidad del receptor dopaminérgico que aumenta la respuesta ante agonistas dopaminérgicos. Esto genera que la vía directa sea más excitable con menos dopamina, compensando la actividad entre ambas vías del movimiento. Asimismo, el hecho de que la nicotina modifique la activación de la vía directa, es un punto de partida para nuevos tratamientos, debido a que los tratamientos actuales se enfocan en modificar principalmente la vía indirecta.

REFERENCIAS

- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12, 366-375.
- Aoki I., Naruse S., Tanaka C. (2004) Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of brain activity and applications to early detection of brain ischemia. *NMR Biomed*. 17, 569-580
- Arias-Carrión O. (2008) Basic mechanisms of rTMS, Implications in Parkinson's disease. *Int Arch Med*, 1, 04
- Baron, J. A. (1986) Cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology*, 36. 1490-1496.
- Bennett, B.D., Bolam, J.P. (1994) Synaptic input and output of parvalbumin-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat. *Neuroscience*, 62, 707-719.
- Bennett, B.D., Wilson, C.J. (1999) Spontaneous activity of neostriatal cholinergic interneurons *in vitro*. *J Neurosci*, 19, 5586-5596
- Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B., DeLong, M.R. (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of Parkinson. *J. Neurophysiol*, 72, 507-520
- Berke, J.D. (2008) Uncoordinated firing rate changes of striatal fast-spiking interneurons during behavioral task performance. *J Neurosci*, 28, 10075-10080
- Berke, J.D., Okatan, M., Skurski, J., Eichenbaum, H.B. (2004) Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron* 43, 883-896.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20, 415-455.

Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A.L., Sadoul, R., Verna, J.M. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP, contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 65, 135-172

Bohnen NI, Gedela S., Kuwabara H., Constantine GM., Mathis CA., Studenski SA., and Moore RY. (2007). Selective hyposmia and nigrostriatal dopaminergic denervation in Parkinson's disease, *Journal of Neurology* (254) 84:90

Bolam, J.P., Bennett, B. (1995) The microcircuitry of the neostriatum. En, Ariano M., Surmeier, D.J., (Eds). *Molecular and cellular mechanisms of neostriatal functions*. (p.p 1-19) Austin, TX, R.G. Landes

Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A.C., Evan, B. (2000) Synaptic organization of the brain, *J. Anat*, 196, 527-542

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A. y Bernardi, G. (2000). Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends in neuroscience*, 23, 120-126

Cenci, M.A., Kalén, P., Mandel, R.J., Wictorin, K., Bjorklund, A. (1992) Dopaminergic transplants normalize amphetamine and apomorphine induced Fos expression in the 6-hydroxydopamine lesioned striatum, *Neuroscience*, 46, 943-957

Centonze, D., Bracci, E., Pisani, A., Gubellini, P., Bernardi, G., Calabresi, P. (2002) Activation of dopamine D1-like receptors excites LTS interneurons of the striatum. *Eur. J. Neurosci*, 15, 2049–52

Chase, T.N. (1998) Neostriatal mechanisms in Parkinson's disease. *Neurology* 51, 30–35

Chaudhuri K.R., Yates L., Martinez-Martin P., (2005) The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. *Curr Neurol Neurosci*, 5, 275–283

Creese, I., Burt, D.R. y Snyder, S.H. (1977) Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science*, 197, 596–598.

Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering, A.F., Wokosin, D., Ilijic, E., Sun, Z., Sampson, A.R., Mugnani, E., Deutch, A.Y., Sesach, S.R., Arbuthnott, G.W., Surmeier, D.J. (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9, 251-259

DeLong, M.R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosc.*, 13, 281-285

Deng, Y.P., Lei, W.L., Reiner, A. (2006) Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labeling. *J Chem Neuroanat*, 32, 101-116

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68:384-386.

Dragunow, M., Williams, M. y Faull, R. L. M. (1990) Haloperidol induces Fos and related molecules in intrastriatal grafts derived from fetal striatal primordial, *Brain Res*, 530, 309-311.

Driver JA, Logroscino G, Gaziano JM, Kurth T (2009) Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology*, 72:, 32-438.

Drucker-Colín, R., Anías-Calderón, J. (2005) Ganglios basales. En Drucker-Colín R. (Eds.), *Fisiología Médica* (p.p 853-860). México, Manual Moderno

Factor S.A. (2004) Literature review: intermittent subcutaneous apomorphine therapy in Parkinson's disease. *Neurology* 62:S12-17.

Fagerstrom K.O., Pomerleau O., Giordani B., Stelson F. (1994) Nicotine may relieve symptoms of Parkinson's disease. *Psychopharmacology* (Berl) 116:117-119.

Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C. (2003) Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J. Neurosci*, 23, 9116–9122

Fratiglioni, L., Wang, H.X., (2000) Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease, review of the epidemiological studies. *Behav. Brain Res*, 113, 117– 120.

Fujiyama, F., Sohn, J., Nakano, T., Furuta, T., Nakamura, K.C. (2011) Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons, a single neuron-tracing study using a viral vector. *Eur. J. Neurosci*, 33, 668–77

Galvan, A., y Wichmann, T. (2007) GABAergic circuits in the basal ganglia and movement disorders, *Progress in Brain Research*, 160, 287-200

García-Montes JR, Boronat-García A, López-Colomé AM, Bargas J, Guerra-Crespo M., Drucker-Colín R (2012), Is nicotine protective against Parkinson's Disease? An experimental analysis, *CNS & Neurological Disorders-drug Targets* (en prensa)

Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Sibley, D.R. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250, 1429-1432

Gerfen, C.R., McGinty, J.F., y Young, W.S. III. (1991) Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P and enkephalin expression in striatal neurons, in situ hybridization histochemical analysis. *J Neurosci*, 11, 1016–31.

Gerfen, C.R. (2003) D1 Dopamine Receptor Supersensitivity in the Dopamine-Depleted Striatum Animal Model of Parkinson's Disease, *The neuroscientist*, 9, 455-462

Gerfen, C.R. y Surmeier, D.J. (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Ann Rev Neurosc*, 34, 441-466

Gerfen, C.R. y Wilson, C.J. (1996) The Basal Ganglia. En, Swanson LW, Bjorklund A, Hokfelt T (eds) *Handbook of chemical neuroanatomy* (12th ed, p.p 317-468), Amsterdam, Elsevier

Gittis, A.H., Nelson, A.B., Thwin, M.T., Palop, J.J., Kreitzer, A.C. (2010) Distinct roles of GABAergic interneurons in the regulation of striatal output pathways. *J Neurosci* 6, 2223–2234

Gorell J.M., Rybicki B.A., Johnson C.C., Peterson E.L. (1999) Smoking and Parkinson's disease: a dose-response relationship. *Neurology* 52:115-119.

Graybiel, A. M., Moratalla, R., y Robertson, H. A. (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6912-6916.

Grandinetti, A., Morens, D.M., Reed, D., MacEachern, D. (1994) Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* 139, 1129–1138.

Gregório, M.L., Wietzioski, E.C., Ferro, M.M., Silveira, J.L.M., Vital, M.A., Da Cunha, C. (2009) Nicotine induces sensitization of turning behavior in 6-Hydroxydopamine lesioned rats, *Neurotox Res*, 15,359-366

Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Greene, L.A. (1986) Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, 234, 80–83

Hajós, M., Hajós-Koresok, E. y Sharp, T. (1999) Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat., *British J of Pharmac*, 126,1741-1750

Hauber, W. (1998) Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Progress in Neurobiology* 56, 507-540

Hernan M.A., Zhang S.M., Rueda-deCastro A.M., Colditz G.A., Speizer F.E., Ascherio A. (2001) Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Ann Neurol* 50:780-786.

Herry, C., Bach, D.R., Esposito, F., Di Salle, F., Perrig, W., Scheffler, C., Luthi, A., Seifritz, E. (2007) Processing of Temporal Unpredictability in Human and Animal Amygdala, *The Journal of Neuroscience*, 22, 5958–5966

Hikosaka, O., Takikawa, Y., Kawagoe, R. (2000). Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol Rev* 80,953-978

Hunt, S. P., Pini, A., y Evan, G. (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature*, 328,632-634

Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Emson, P.C. (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10, 3421-3438

Kelly, P. H. (1977) Drug-induced motor behavior. En: , Iversen, L. L. y Snyder, S.H., (Eds.) *Handbook of Psychopharmacology*New (p.p. 295-331) York: Plenum Press

Kemp, J. M. and Powell, T. P. (1971) The structure of the caudate nucleus of the cat, light and electron microscopy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 262, 383-401

Kiba, H., Jayaraman, A. (1994), Nicotine-induced c-fos expression in the striatum is mediated mostly by dopamine D1 receptor and is dependent on NMDA stimulation. *Mol Brain Res* 23,1–13

Kim, S.J., Kim, M.Y., Lee, E.J., Ahn, Y.S., Baik, J.H. (2004) Distinct regulation of internalization and mitogen-activated protein kinase activation by two isoforms of the dopamine D2 receptor. *Mol. Endoc.*, 3, 640-652

Kitai, y Surmeier (1993) Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv. Neurol.* 60,40–52

Kock, C.P., Bruno, R.M., Spors, H., Sakmann, B. (2007) Layer- and cell-type-specific suprathreshold stimulus representation in rat primary somatosensory cortex. *J Physiol*, 581,139–154.

Koós y Tepper (1999) Inhibitory control of neostriatal projectionneurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2,467-472

Koós, T. y Tepper, J.M. (2002) Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci* 22,529-535

Kravitz, A.V., Freze, B.S., Parker, B., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., Kreitzer, A.C. (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466,622-428

Kubota, Y., Kawaguchi, Y. (2000) Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. *J Neurosci* 20,375-386

Lawrence, J., Stroman, P.W., Bascaramurty, S., Jordan, L.M., Malisza, K.I. (2004) Correlation of functional activation in the rat spinal cord with neuronal activation detected by immunohistochemistry, *NeuroImage* 22, 1802– 1807

LeDoux, J.P. (2005) D3/Knock-in and knock-out models. En: Animal models of movement disorders (p.p.200-205), USA: Elsevier

Le Houezec, J., Martin, C., Cohen, C., Molimard, R. (1989) Failure of behavioral dependence induction and oral nicotine bioavailability in rats. *Physiol Behav* 45, 103-108

Librizzi, L., Regondi, M.C., Pastori, C., Frigerio, S., Frassoni, de Curtis M. (2007) Expression of Adhesion Factors Induced by Epileptiform Activity in the Endothelium of the Isolated Guinea Pig Brain In Vitro. *Epilepsia*, 48,743-751

Lundblat, M., Picconi, B., Lindgren, H., Cenci, M. A. (2004) A model of L-DOPA induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice, relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of disease*, 16,110-123

Luo, Y.Q., Kokkonen, G.C., Wang, X.T., Neve, K.A., Roth, G.S. (1998) D2 dopamine receptors stimulate mitogenesis through pertussis toxin-sensitive G proteins and ras-involved ERK and SAP/JNK pathways in rat C6-D2L glioma cells. *J Neurochem*, 71,980–990

Magdalena Guerra-Crespo, Alberto K De la Herrán-Arita, Arturo Hernández-Cruz, José Bargas and René Drucker-Colín. Cell therapy for Parkinson's disease: Failure or success?. In: STEM CELLS IN CLINIC AND RESEARCH. Gholamrezanezhad, A. (Ed) Intech. Croatia. Capitulo 16, pp.401-436, 2011.

Malinow, R. y Malenka, R.C. (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity, *Annu Rev Neurosci* 25,103-126

Mallet, N., Le Moine, C., Charpier, S., Gonon, F. (2005) Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. *J Neurosci* 25,3857–3869

Mansvelder, H.D., McGehee, D.S., (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine, *Neuron* 27, 349–357

Marttila, K., Raattamaa, H., Ahtee, L. (2006) Effects of chronic nicotine administration and its withdrawal on striatal FosB/ Δ FosB and c-Fos expression in rats and mice, *Neuropharmacology*, 51, 44-51

McCallum, S.E., Parameswaran, N., Bordia, T., McIntosh, J.M., Grady, S.R., Quirk, M. (2005) Decrease in $\alpha 3^*/\alpha 6^*$ nicotinic receptors but not nicotine-evoked dopamine release in monkey brain after nigrostriatal damage. *Mol Pharmacol* 68,737–746.

Mink, J.W. (2003). The basal ganglia and involuntary movements, impaired inhibition of competing motor patterns, *Arch. Neurol.*, 60,1365–68

- Morens D.M., Grandinetti A., Reed D., White L.R., Ross G.W. (1995) Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology.*, 6, 1041-51.
- Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., Curran, T. (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237,192–197.
- Mudó, G., Belluardo, N., Fuxe, K. (2007) Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs. Progress in molecular mechanisms. *J Neural Transm*, 114,135–47
- Narabayashi, H., Yokochi, F. y Nakajima, Y. (1984). Levodopa-induced dyskinesia and thalamotomy. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 47,831-839
- Nashmi, R., Xiao, C., Deshpande, P., McKinney, S., Grady, S.R., Whiteaker, P., Huang, Q., McClure-Begley, T., Lindstrom, J.M., Labarca, C., Collins, A.C., Marks, M.J., Lester, H.A. (2007) Chronic nicotine cell specifically upregulates functional $\alpha 4^*$ nicotinic receptors, basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path. *J Neurosci* 27,8202-8218.
- Neve, K.A., Seamans, J.K., Trantham-Davidson, H. (2004) Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 24,165–205
- Nicola, S.M., Surmeier, J., Malenka, R.C. (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Ann Rev Neurosci* 23, 185-215
- Nisell, M., Nomikos, G.G., Chergui, K., Grillner, P., Svensson, T.H. (1997) Chronic Nicotine Enhances Basal and Nicotine-Induced Fos Immunoreactivity Preferentially in the Medial Prefrontal Cortex of the Rat, *Neuropsychopharmacology*, 17, 151-162
- Pahua, R., James, M., Leigh, P.N., Summers, B.A., Marsen, C.D., Quinn, N.P., Lange KW., Robbins TW., (1997) High-frequency stimulation of the globus pallidus for the treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 49,249-253

Parain, K., Marchand, V., Dumery, B., Hirsch, E., (2001) Nicotine, but not cotinine, partially protects dopaminergic neurons against MPTP-induced degeneration in mice. *Brain Res.* 890, 347– 350

Parthasarathy, H.B., Graybiel, A.M. (1997) Cortically driven immediate-early gene expression reflects modular influence of sensorimotor cortex on identified striatal neurons in the squirrel monkey. *J Neurosci.* 17,2477–2491

Paxinos y Watson, (1986) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, *Academic Press*, San Diego

Quarta, D., Ciruela, F., Patkar, K., Borycz, J., Solinas, M., Lluís, C., Franco, R., Wise, R. A., Goldberg, S. R., Hope, B. T., Woods, A. S., and Ferre, S. (2007) Heteromeric nicotinic acetylcholine-dopamine autoreceptor complexes modulate striatal dopamine release. *Neuropsychopharmacology* 32, 35– 42

Quik, M. (2004) Smoking, nicotine and parkinson's disease, *TRENDS in neurosciencie* 27,561-568

Quik M., Coxm H., Parameswaran, N., O'Leary, K., Langston, J.W., Di Monte, D. (2007) Nicotine Reduces Levodopa-Induced Dyskinesias in Lesioned Monkeys, *Annals of Neurology* 62,588-596

Quik, M., Jeyarasasingam, G. (2000). Nicotinic receptors and Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 393, 223– 230.

Quik, M. y McIntosh, J.M. (2006) Striatal $\alpha 6$ Nicotinic Acetylcholine Receptors, Potential Targets for Parkinson's Disease Therapy, *J of Pahrmac and Experim Therap* 316,481-489

Quik, M., Summ J.D., Whiteaker, P., McCallum, S.E., Marks, M.J., Musachio, J., McIntosh, J. M., Collins, A.C., Grady, S.R. (2003) Differential declines in striatal nicotinic receptor subtype function after nigrostriatal damage in mice. *Mol. Pharmacol.* 63, 1169 – 1179

Ramanathan, S., Hanley, J.J., Deniau, J.M., Bolam, J.P. (2002) Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto GABAergic interneurons in the rat striatum. *J Neurosci*, 22,8158–8169

Ren, T., Sagar, S.M. (1992) Induction of c-fos immunostaining in the rat brain after systemic administration of nicotine. *Brain Res Bull* 29,589–597

Robertson, G.S., Herrera, D.G., Dragunow, M., Robertson, H.A. (1989) L-Dopa activates c&s expression in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur J Pharmacol*, 159,99-100

Rusak, B., Robertson, H.A., Wisden, W., Hunt, S.P. (1990) Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus, *Science*, 248,1237–1240.

Rymar, V.V., Sasseville, R., Luk, K.C., Sadikot, A.F. (2004) Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J Comp Neurol* 469,325-339

Salminen, O., Lahtinen, S., Ahtee, L. (1996) Expression of Fos protein in various rat brain areas following acute nicotine and diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 54,241-248

Salminen, O., Seppâ, T., Gâddnâs, E., Ahtee, L. (1990) The Effects of Acute Nicotine on the Metabolism of Dopamine and the Expression of Fos Protein in Striatal and Limbic Brain Areas of Rats during Chronic Nicotine Infusion and Its Withdrawal, *The Journal of Neuroscience*, 18,8145-8151

Salminen, O., Murphy, K.L., McIntosh, J.M., Drago, J., Marks, M.J., Collins, A.C., y Grady, S.R. (2004) Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice. *Mol Pharmacol* 65,1526–1535.

Sedelis, M., Hofele, K., Auburger, G.W., Morgan, S., Huston, J.P., Schwarting, R.K. (2000), MPTP susceptibility in the mouse, behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet.* 30,171–82.

Sedelis, M., Schwarting, R.K., Huston, J.P. (2001), Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 125,109–25

Shim, I., Javaid, J.I., Wirtshafter, D., Jang, S.Y., Shin, K.H., Lee, H.J., Chung, Y.C., Chun, B.G. (2001) Nicotine-induced behavioral sensitization is associated with extracellular dopaminerelease and expression of c-Fos in the striatum and nucleus accumbens of the rat *Behavioural Brain Research*, 121,137–147

Simola, N., Morelli, M., Carta, A. (2007), The 6-hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease, *Neurotoxicity Research* . 11,151-167

Surmeier, D.J., Bargas, J., Hemmings, H.C., Nairn, A.C., Greengard, P. (1995) Modulation of calcium currents by a D₁ dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14,385-397

Surmeier, D.J., Eberwine, J., Wilson, C.J., Cao, Y., Stefani, A., Kitai, S.T. (1992) Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89,10178–82

Surmeier, D.J., Kitai, S.T. (1993) D₁ and D₂ dopamine receptor modulation of sodium potassium currents in rat neostriatal neurons. *Progress in Brain Research* ,309-324

Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., Shen, W. (2007) D₁ and D₂ dopaminereceptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30,228–235

Sutton, M.A., Schuman, E.M. (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127,49–58

- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.A., Nairn, A.C., Greengard, P. (2004). DARPP-32, an integrator of neurotransmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44,269–96
- Taylor, J.R., Elsworth, J.D., Roth, R.H., Sladek, J.R., Redmond, D.E. (1997) Severe long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Neuroscience.* 81,745–55
- Taverna, S., Ilijic, E., Surmeier, D.J. (2008) Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 28,5504–5512
- Tecuapetla-Aguilar, F. (2007) Plasticidad en la transmisión sináptica GABAérgica en el neocórtex, Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias, México, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular.
- Tepper, J.M., Bolam, J.P. (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14,658-692
- Tepper, J.M., Lee, C.R. (2007) GABAergic control of substantia nigra dopaminergic neurons. *Prog Brain Res* 160,189-208
- Tepper, J.M., Tecuapetla, F., Koós, T., Ibañez-Sandoval, O. 2010. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front. Neuroanat.* 4,1–18
- Tissingh G., Berendse H.W., Bergmans P., DeWaard R, Drukarch B., Stoof J.C., Wolters E.C. (2001). Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. *Mov Dis*, 16, 41–46
- Toulouse A. y Sullivan A. M. (2008). Progress in Parkinson's disease-where do we stand?. *Prog Neurobiol* 85, 376-392.
- Unal, B., Ibañez-Sandoval, O., Shah, F., Abercrombie, E.D., Tepper, J.M. (2011) Distribution of tyrosine hydroxylase-expressing interneurons with respect to anatomical organization of the neostriatum. *Front. In Neurosc.*, 5, 1-11

Ungerstedt, U. (1971a) Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta physiol scand. Suppl.* 367, 49-68.

Ungerstedt, U. (1971b) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of nigro-striatal dopamine system. *Acta physiol, scand. Suppl.* 367, 69-93

Ungerstedt, U., Ljungberg, T., Hoffer, B. y Siggins, G. (1975) Dopaminergic supersensitivity in the striatum. *Adv. Neurol.*, 9, 57-65.

Vieyra-Reyes, P. (2008), Estudio del efecto antidepresivo y adictivo de la nicotina, Tesis de doctorado, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Villafane, G., Cesaro, P., Rialland, A., Baloul, S., Azimi, S., Bourdet, C., Le Houezec, J., Macquin-Mavier, I., Maison, P. (2007) Chronic high dose transdermal nicotine in Parkinson's disease: an open trial. *Eur J Neurol* 14:1313-1316.

Wang, Y., Markram, H., Goodman, P.H., Berger, T.K., Goldman-Rakic, P.S. (2006) Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 9,534-542

West, A.R., Floresco, S.B., Charara, A., Rosenkranz, J.A., Grace, A. (2003) Electrophysiological interactions between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. *Ann NY Acad Sci* 1003,53-74

Wichmann, T., DeLong, M.R., (2003) Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 91,9-18

Wickens, J.R., Reynolds, J.N.J., Hyland, B.I. (2003) Neural mechanisms of reward-related motor learning. *Curr. Op. in Neurob.*, 6, 685-690

Wilson, J.C. y Kawaguchi, Y. (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J Neurosci* 16, 2397-2410

- Wilson, C.J. (1988) *The Synaptic Organization of the Brain* (4th Edition).
- Wilson, J.C. (2004) Basal Ganglia (p.p 361-413). En: Shepherd GM (Ed), *The Synaptic Organization of the Brain*, (5th ed) Nueva York: Oxford University Press
- Wilson, C.J. (2007) GABAergic inhibition in the striatum, *Progress in Brain Research* 160,91-107
- Wooltorton, J.R., Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA. (2003) Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J. Neurosci* 23,3176-3185
- Xiao, C., Nashmi, R., McKinney, S., Cai-Haijiang, McIntosh J.M., y Lester H.A. (2009) Chronic nicotine selectively enhances alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in the nigrostriatal dopamine pathway. *The journal of Neuroscience* 29,12428-12439
- Yamazaki, Y., Ren, K., Shimada, M., Iwata, K. (2008) Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammation in rats, *Experimental Neurology* 214, 209–218
- Young W. S. III, Bonner T. I. y Brann M. R. (1986) Mesencephalic dopaminergic neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9827-9831.
- Zhou, F. M., Liang, Y., y Dani, J. A. (2001) Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat. Neurosci.* 4, 1224 –1229